REDAZIONE, VERIFICA, APPROVAZIONE, EMISSIONE

REDAZIONE	*Biologa Dirigente: Dott.ssa Lecchini Rita, dott.ssa Giuseppina Portararo* *TSLB: Dell'Uva Michele, Calabrese Anna*	
VERIFICA	*Dott.ssa Francesca Tanzi Responsabile Accreditamento Servizio Immunoematologia e Medicina Trasfusionale*	
APPROVAZIONE	*Dott.ssa Lecchini Rita Biologa Dirigente, Dott. Alberto Cepparulo Dirigente Medico*	
EMISSIONE	*Dott.ssa Francesca Tanzi Responsabile Accreditamento Servizio Immunoematologia e Medicina Trasfusionale*	

STATO DELLE REVISIONI

REV. N.	**SEZIONI REVISIONATE**	**MOTIVAZIONE DELLA REVISIONE**	**DATA**
0	Prima Stesura		10/05/2010
1	Tutte	Aggiornamento	10/05/2013

ELENCO ALLEGATI

ALL. N.	**Codice**	**DESCRIZIONE ALLEGATO**	**REV. N.**

SOMMARIO

1. SCOPO/OBIETTIVO

Lo scopo di questo manuale è descrivere le Istruzioni Operative del Settore Immunoematologia

2. CAMPO DI APPLICAZIONE

Si applica a tutti i campioni di sangue (accompagnati da richiesta) che afferiscono in provetta contrassegnata dal cognome e nome, reparto e data e controfirmate dal medico o dall'infermiere che ha eseguito il prelievo. Si applica sui campioni ottenuti dalla spremitura dei "budellini" delle sacche di sangue conservate nelle emoteche del Settore "Abbinamento" che vengono impiegati debitamente barcodati negli strumenti Innova I e III per l'esecuzione delle prove crociate. Si applica sui campioni previa applicazione del barcode assegnato dal sistema gestionale Cetraplus e destinati all'esecuzione di test di ricerca di autoanticorpi e isoanticorpi antieritrocitari (TCD e TCI). Infine si applica ai campioni dei pazienti interni ed esterni ai reparti della Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma accettati in Routine e in Urgenza.

3. LUOGO DI APPLICAZIONE

OSPEDALE /DIPARTIMENTO/U.O./SERVIZIO
Azienda Ospedaliero-Universitaria Di Parma
Dipartimento Di Patologia E Medicina Di Laboratorio
Servizio Di Immunoematologia E Medicina Trasfusionale
Settore Abbinamento (Stanza N° 51)
Settore Prove Crociate (Stanza N°40)

4. RIFERIMENTI NORMATIVI E DOCUMENTALI

Autore	Titolo	Data
AABB	Tecnical Manual. 15^Ediz.	2009
Ortho-Clinical Diagnostics,Inc. Johnson& Johnson	Fogli illustrativi del commercio.	----
Heraeus	Manuale d'istruzioni centrifughe Heraeus	

5. ABBREVIAZIONI, DEFINIZIONI E TERMINOLOGIA

ABBREVIAZIONI	
FdL	Foglio di lavoro.
GRE	Gruppo esterno
TCD	Test di COOMBS Diretto
TCI	Test di COOMBS Indiretto
DEFINIZIONI E TERMINOLOGIA	
Surgiscreen	Pannello a tre cellule del commercio (Pool di donatori di emazie a profilo antigenico noto) per la ricerca di Anticorpi irregolari (test di Coombs indiretto).
Affirmagen A_1, A_2,B,O	Emazie del commercio a concentrazione nota 3±1% per la determinazione del gruppo indiretto.
Ortho Bliss	Soluzione del commercio per ottimizzare la reazione Antigene-Anticorpo.
Controllo di qualità interni Ortho CQ ConfideWB	Pannello di eritrociti e plasma/sieri umani

6. MODALITA' OPERATIVE

6.1 *DESCRIZIONE DELLE ATTIVITA' NEL SETTORE IMMUNOEMATOLOGIA*

PROVE CROCIATE

Sui Pazienti che devono ricevere sacche di sangue da donatori vengono di regola eseguiti i seguenti test immunoematologici mediante metodo in schedina con l'utilizzo della strumentazione in uso ORTHO AutoVue Innova e relativi reagenti e materiale (vedi tab.1 di 1).

Tab.1 di 1

Accesso	Profilo su Innova	Descrizione	Materiale (schedine)	Reagenti
PAZIENTI	PROVA CROCIATA	-Cross-match tra siero del ricevente ed emazie dei donatori -Gruppo ABO/Rh (test diretto e test indiretto) in caso di GRE	- Schedine Biovue System Anti-IgG, C3d polyspecific Schedine Biovue System antiA/antiB/antiD, - Schedine Biovue antiA/antiB/antiAB/anti D/antiCDE/Control - Schedine Reverse Diluent	- Soluzione fisiologica per diluizione delle emazie - Ortho Bliss - Affirmagen A_1,B,O
		FENOTIPO / KELL	- Biovue antiC/antiE/antic/antie/antiK/Control.	-Soluzione fisiologica per diluizion delle emazie
	TYPE & SCREEN	Ricerca anticorpi irregolari (Test di Coombs indiretto)	- Schedine Biovue System Anti-IgG, C3d polyspecific	- Ortho Bliss - Surgiscreen ($S_1S_2S_3$ eritrociti di gruppo 0)
	GRUPPO DI VERIFICA	Gruppo ABO/Rh (test diretto)	Schedine Biovue System anti-A/anti-B/anti-D,	- Soluzione fisiologica per diluizione delle emazie
Predepositi (settore gruppi)	GRUPPO DI VERIFICA e/o TYPE	Gruppo ABO/Rh (test diretto)	Schedine Biovue System antiA/antiB/antiD,	- Ortho Bliss
		Ricerca anticorpi irregolari (Test di Coombs indiretto)	Schedine Biovue System AntiIgG,C3d polyspecific	- Ortho Bliss - Surgiscreen ($S_1S_2S_3$ eritrociti di gruppo 0)

- **PROVETTE**

Provette barcodate tappo viola da 5.4 ml con sangue intero prelevato in K2EDTA. Sottoporre a centrifugazione a 3500 RPM per 3 minuti le provette per effettuare la ricerca del gruppo indiretto, delle prove crociate e degli auto/isoanticorpi irregolari.

- **RICEVIMENTO E CONTROLLO DELLE RICHIESTE E DELLE PROVETTE**

All'arrivo delle richieste e delle provette raccolte presso i reparti ospedalieri o nelle Case di Cura o il domicilio dei pazienti, l'analista controlla la corrispondenza della richiesta con la provetta. Verifica che entrambe siano firmate dal medico e/o dall'infermiere e che ci sia materiale sufficiente all'esecuzione dell'analisi

- **MATERIALE PER L'ANALISI**

1. PROVETTE CON TAPPO VIOLA da 5.4 ml con sangue intero prelevato in K2EDTA identificate con barcode univoco, stampato in fase di accettazione (vedi ACCETTAZIONE)
2. Schedine ORTHO riferimento Tab.1 di 1
3. SOLUZIONE SALINA (SODIO CLORURO 0.9%)
4. PIASTRA PER LE DILUIZIONI
5. ACQUA DEMINERALIZZATA
6. SURGISCREEN
7. AFFIRMAGEN A_1, B, 0
8. REAGENTI PER TEST CQ CONFIDENCE ™WB (CONTROLLO DI QUALITA' GIORNALIERO)
9. CENTRIFUGA HERAEUS
10. STRUMENTO INNOVA

- **PREPARAZIONE ALL'ANALISI**

Allestimento strumento Innova

Il TSLB (che trova lo strumento con tutti gli sportelli aperti) prima di procedere all' accensione dello strumento controlla che lo strumento INNOVA sia in condizioni di procedere all' esecuzione delle analisi. Pertanto verifica che:

- la tanica dell' acqua demineralizzata sia piena;
- la tanica della soluzione salina (SODIO CLORURO 0.9%) sia piena;
- la tanica del waste (scarico) sia stata svuotata;
- il contenitore rifiuti (lo scarico delle schedine lette) SIA STATO SVUOTATO . ATTENZIONE: svuotare lo scarico delle schedine prima di procedere all' accensione dello strumento. A strumento acceso ricordarsi di dargli il comando
- il cassetto dove sono caricate le schedine non sia vuoto e nel caso ha la possibilità di rifornirlo delle schedine mancanti;
- la bottiglia contenente la soluzione per procedere alla disinfezione dell' ago sia piena
- caricare la piastra per le diluizioni sullo strumento.

Una volta eseguite tutte le operazioni sopra descritte l' analista provvede a chiudere tutti gli sportelli dello strumento e potrà procedere all'accensione dello stesso (6.2)

- **CONTROLLI DI QUALITÀ**

Prima di procedere alle analisi è necessario eseguire i controlli di qualità interni (6.6). Validati i risultati viene eseguita la stampa del referto che viene firmato sia dal responsabile del settore presente che dal TSLB e archiviato nel settore di appartenenza. Al termine è necessario lasciare a bordo dello strumento il rack dei reagenti per la prosecuzione delle analisi.

- **ESECUZIONE ANALISI**

Preparazione dei campioni all' analisi

Campioni dei pazienti per prove crociate, Type & Screen, per auto/iso anticorpiantieritrocitari

Sottoporre a centrifugazione a 3500 RPM per 3 minuti (RIF. A MANUALE D' USO) le provette relative per effettuare la prova di compatibilità, la ricerca del gruppo indiretto e di anticorpi irregolari.

N.B. nel caso in cui non sia possibile l'interfacciamento tra il gestionale e lo strumento Innova è possibile inserire manualmente i relativi profili su Innova (6.3).

Processazione dei campioni

Disporre le provette negli appositi rack dello strumento (max 9 campioni per rack, max 4 rack per ciclo):

- Selezionare sul monitor "SPORTELLO ACCESSO" e attendere l' apertura dello sportello
- Inserire i rack: lo strumento esegue automaticamente la lista di lavoro trasmessa da host.
- Verificare la corretta corrispondenza tra la lista di lavoro trasmessa e il numero di campioni caricati (vedi manuale dello strumento)
- I campioni caricati sui rack vengono evidenziati sul monitor dello strumento in ROSSO con simbolo "U"(tale colorazione indica che l' esame è in corso)
- Una volta terminata l' analisi i campioni caricati sui rack verranno evidenziati di colore VERDE, CON SIMBOLO "R"
- Al termine della processazione dei campioni si ha la possibilità di scaricare i rack e di caricarne dei nuovi come sopra descritto.
- Terminate le analisi procedere allo spegnimento dello strumento (6.2)

ATTENZIONE**: Non interrompere il ciclo di lavoro fino a completamento della processazione dei campioni a bordo (verificare dal monitor che i rack caricati assumano la colorazione da rossa a verde).**

TEST AGGIUNTIVI: in alcuni casi è necessario proseguire con dei tests aggiuntivi come la ricerca del Du o del Cellano oppure la ricerca degli alloanticorpi irregolari in maniera più estesa per mezzo del PANEL A o B o C ficinato o no (ficin trated or untrated). In alcuni casi, una volta individuato l'alloanticorpo irregolare è necessario eseguire una tipizzazione specifica delle emazie del donatore con degli antisieri specifici.

1. **Tipizzazione fenotipo D^u**. Nelle analisi della profilassi della MEN le emazie che danno risultato negativo con anti-D debbono essere sottoposte alla tipizzazione del fenotipo D^u al fine di individuare l'eventuale presenza di una forma debole o parziale dell'antigene D. Le gravide che presentano agglutinazione positiva, dopo essere state trattate con anticorpi

specifici anti D, vanno considerati **Rh negative D^u positive**; le gravide che non presentano agglutinazione vanno considerati **Rh negativi D^u negativi** (6.28)

2. **Ricerca antigene Cellano**: Le emazie che danno risultato Kell positivo, talvolta, debbono essere sottoposte alla tipizzazione per la ricerca dell'antigene Cellano (6.29). Le emazie che presentano agglutinazione positiva dopo che sono stati cimentati con il siero anti-cellano vanno considerati **Kk**; i donatori che presentano agglutinazione negativa vanno considerati "cellano negativi" **KK.**

3. **Altre tipizzazioni eritrocitarie** (6.24 - 6.25)

4. **Ricerca degli alloanticorpi irregolari tramite Panel A o B o C** (6.3)

- **REGISTRAZIONE E VALIDAZIONE DEI RISULTATI**

Il biologo o il medico valida a video i risultati relativi alla compatibilità delle prove crociate, della corrispondenza del gruppo dei pazienti e l'assenza di anticorpi irregolari nel caso del Type & Screen, valutando caso per caso le discordanze che si possono verificare, mediante lettura diretta delle schedine che lo strumento posiziona sul casunca. Al termine trasmette i risultati da Innova a Cetraplus, appone la firma sul registro dove sono posizionate le etichette delle prove crociate e dei Type . Registra inoltre gli esiti delle tipizzazioni di gruppo comprensivi di eventuale D^u e Cellano, o di altre tipizzazioni che si rendessero necessarie al fine di validare la compatibilità delle prove crociate. Infine stampa i risultati dei gruppi sanguigni o delle ricerche di auto/isoanticorpi antieritrocitari nelle ricerche immunoematologiche e di profilassi della MEN.
Alla fine della validazione delle prove crociate e dei type le richieste vanno archiviate negli appositi cassetti posizionati all'interno del settore.

- **SMALTIMENTO CAMPIONI**

Al termine delle analisi, dopo avere verificato e stampato gli esiti ottenuti, i campioni vengono stoccati in un porta-provette sul quale viene specificato: la data di prelievo del campione e il tipo di analisi da effettuare (es. "PROVE CROCIATE DEL gg/mm/aa") e conservati a fine giornata nel frigo dedicato per un massimo di 10 giorni e poi eliminati come rifiuti speciali nell'apposito contenitore. Riferimento"MANUALE AD USO DEGLI OPERATORI SANITARI" per rifiuti Ospedalieri dell' Azienda Ospedaliera di Parma vedi paragrafi inerenti ai RIFIUTI SANITARI PERICOLOSI A RISCHIO INFETTIVO

6.2 ACCENSIONE E SPEGNIMENTO INNOVA

Lo strumento Innova viene avviato procedendo all’ accensione nel seguente ordine:

- accensione dello strumento;
- accensione del PC e inserimento del login utente e password;
- avvio del sistema operativo e inserimento login utente e password personale.

Una volta avviato il sistema operativo, prima di procedere a qualsiasi tipo di operazione, accertarsi che nella schermata (vedi in alto a DX) la dicitura “ ROUTINE “ sia evidenziata di colore verde in caso contrario attendere che lo strumento termini le operazioni in programma .
A questo punto l’operatore è in grado di procedere con la manutenzione giornaliera (che consiste nella sanitizzazione dell’ago) e successivamente se richiesto la manutenzione settimanale.
(vedi manuale d’ uso e manutenzione dello strumento Capitolo 8 sez. C pag. 8-24).

Al termine della processazione dei campioni il TSLB scarica i rack, ripone i reagenti nel frigorifero dedicato mentre le provette dei campioni vengono stoccate nel porta-provette e conservate nel frigorifero dedicato.
Prima di procedere allo spegnimento l’operatore si deve accertare che il biologo abbia eseguito sullo strumento Innova archiviazione dei dati ottenuti dall’ analisi cliccando su “ LISTA DI LAVORO” verificando che non sia presente alcuna lista di lavoro.
Si puo’ quindi procedere allo spegnimento prima del SISTEMA OPERATIVO dello strumento nel seguente ordine:

- Cliccare su ARRESTO
- A video comparirà la domanda : VUOI SPEGNERE?
- Dare CONFERMA (comparirà la voce ARRESTO IN CORSO e successivamente ARRESTO COMPLETATO)
- Cliccare START e chiudere la sessione di lavoro

La fase successiva comporta lo spegnimento dello strumento (porsi di fronte allo strumento: il tasto si trova sulla destra dell’ operatore) che in seguito si metterà in condizione di “ riposo” e quindi aprirà tutti gli sportelli.

6.3 INSERIMENTO MANUALE DEI VARI PROFILI SU INNOVA 1, 2, 3,4.

- *CAMPIONI*
- *REGISTRA / CARICA*
- *PRIORITA' : NORMALE*
- *PROFILO : (scegliere dalla lista: es. PROVA CROCIATA)*
- *TIPO DI CAMPIONE : CENT BLOOD*
- *CAMPIONE :   (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *PROFILI   (scegliere dalla lista: es. GRUPPO ABD VERIFICA)*
- *CAMPIONI   (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *PROFILO: (scegliere dalla lista: es. PAZIENTE URGENTE)*
- *TIPO DI CAMPIONE: CENTBLOOD*
- *CAMPIONI (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *PROFILO : (scegliere dalla lista: es. TYPE)*
- *TIPO DI CAMPIONE: CENTBLOOD*
- *CAMPIONI (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *PROFILO : (scegliere dalla lista: es. PANEL A o PANEL B o PANEL C)*
- *TIPO DI CAMPIONE: CENTBLOOD*
- *CAMPIONI (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *CAMPIONI (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *INVIA LISTA DI LAVORO*
- *ESCI*

Procedere alla esecuzione dell'analisi secondo le specifiche istruzioni di lavoro.

6.4 TRASMISSIONE DELLA LISTA DI LAVORO DA CETRAPLUS

6.4.1 TRASMISSIONE DELLA LISTA DI LAVORO DELLE PROVE CROCIATE

Procedere all'avvio del computer del gestionale Cetraplus, inserendo Login utente e Passeword personali. Per trasmettere la lista di lavoro inserita precedemente in fase di accettazione (vedi procedure dedicate) dalla schermata principale procedere nel seguente ordine:
Laboratorio → Strumenti → Autovue Innova I o III → cliccare sull'icona Trasmissione Lista di lavoro.
Compare una schermata dove vanno inseriti:

- Da data a data (inserire la data dell'accettazione dell'esame)
- Livello di abilitazione "1"
- Bippare con lo scanner ottico sul barcode della prova crociata
- Selezionare la voce "CONFERMA"
- Compare quindi la lista di lavoro con i gruppi di verifica da trasmettere e selezionare "TRASMISSIONE"
- Ritornare sulla schermata principale e cliccare sull'icona "Prove crociate"
- Ricompare da data a data e omettere il livello di abilitazione "1"
- Andare sul quadratino zigrinato nero e cliccarci sopra e si apre un comando per bippare i vari barcodes delle prove crociate
- Terminato l'inserimento dei barcode cliccare su "OK"
- Ricompare la lista di lavoro delle PX e confermare
- Infine cliccare su "TRASMISSIONE"

A QUESTO PUNTO L'OPERATORE TROVERA' LA LISTA DI LAVORO SUL SULLA SCHERMATA PRINCIPALE DELLO STRUMENTO INNOVA I O III E POTRA' PROCEDERE ALL'ESECUZIONE DELLE PROVE DI COMPATIBILITA'.

6.4.2 TRASMISSIONE DELLA LISTA DI LAVORO DEI TYPE AND SCREEN

Per trasmettere la lista di lavoro inserita precedemente in fase di accettazione (vedi procedure dedicate) dalla schermata principale procedere nel seguente ordine:
Laboratorio → Strumenti → Autovue Innova I o III → cliccare sull'icona Trasmissione Lista di lavoro.
Compare una schermata dove vanno inseriti:

- Da data a data (inserire la data dell'accettazione dell'esame)
- Livello di abilitazione "1"
- Bippare con lo scanner ottico sul barcode del TYPE AND SCREEN
- Selezionare la voce "CONFERMA"
- Compare quindi la lista di lavoro con i gruppi di verifica da trasmettere e selezionare "TRASMISSIONE"

6.4.3 TRASMISSIONE DELLE LISTE DI LAVORO DEI GRUPPI PAZIENTI

Per trasmettere la lista di lavoro inserita precedemente in fase di accettazione (vedi procedure dedicate) dalla schermata principale procedere nel seguente ordine:
Laboratorio → Strumenti → Autovue Innova I o III → cliccare sull’icona Trasmissione Lista di lavoro.
Compare una schermata dove vanno inseriti:

- Da data a data (inserire la data dell’accettazione dell’esame)
- Se i gruppi sono stati inseriti in ROUTINE nella voce TIPO DI ACCESSO selezionare “L”. Se invece sono stati inseriti come “URGENTI” non mettere nulla.
- Livello di abilitazione “1”
- Selezionare la voce “ESAMI IN CORSO” solo se è la prima trasmissione della giornata, dalla seconda in poi selezionare anche la voce “ESAMI NON INVIATI”. Se i gruppi sono stati inseriti in urgenza bippare, invece, il relativo barcode.
- Selezionare la voce “CONFERMA”
- Compare quindi la lista di lavoro con i gruppi da trasmettere e selezionare “TRASMISSIONE”

6.4.4 TRASMISSIONE DELLE LISTE DI LAVORO DELLA PROFILASSI MEN

Per trasmettere la lista di lavoro inserita precedemente in fase di accettazione (vedi procedure dedicate) dalla schermata principale procedere nel seguente ordine:
Laboratorio → Strumenti → Autovue Innova I o III → cliccare sull’icona Trasmissione Lista di lavoro.
Compare una schermata dove vanno inseriti:

- Da data a data (inserire la data dell’accettazione dell’esame)
- Livello di abilitazione “1”
- Bippare con lo scanner ottico sul barcode dell’esame
- Selezionare la voce “CONFERMA”
- Compare quindi la lista di lavoro con i gruppi di verifica da trasmettere e selezionare “TRASMISSIONE”.
- Nel caso di puerpere Rh negative aggiungere direttamente dagli Innova I o III l’esame “TYPE”
- Per eseguire l’esame del “NEONATO” (che comprende il gruppo di verifica e il TCD) barcodare preventivamente il campione con un’etichetta a otto cifre e bipparla direttamente sull’Inoova I o III.

6.4.5 STAMPA DEI REFERTI DI GRUPPO DEI PAZIENTI

Per stampare i referti di gruppo dei pazienti nella schermata principale del gestionale CETRAPLUS procedere nel seguente ordine:

- Laboratorio – Referti – Completo
- Da data a data
- Routine
- Tipo di accesso L – Conferma
- In ” tipo di reparto”: Tutti
- In “Profilo” : Tipizzazione Gruppoematica
- Conferma
- Stampa

Per stampare il referto singolo eseguito in Urgenza:

- Referti
- Singolo
- Bippare il barcode dell’identificativo
- Mettere il flag nel quadratino di stampa
- Stampa

6.5 ESECUZIONE TEST CELLANO E DU

Prima di procedere alla ricerca dell' antigene Cellano e alla ricerca del D^u l' analista deve procurarsi i reagenti:

- Anti-D (Rh1) IgM+IgG per la determinazione del D^u;
- Anti-K (Kell2) per la determinazione del Cellano,

portandoli a temperatura ambiente estraendoli dal frigorifero "G".
Dal sistema operativo dello strumento Innova l' analista può procedere all' esecuzione del/dei test:

- Selezionare la voce CAMPIONI
- Selezionare la voce REGISTRA CARICA
- Alla voce PROFILI selezionare il tipo di test richiesto: D^u o Cellano
- Alla voce TIPO DI CAMPIONE evidenziare SERUM
- In CAMPIONE con la pistola bippare il barcode della provetta contenente il reagente di cui si vuole eseguire il test: D^u o Cellano

ATTENZIONE: NON ESEGUIRE DI SEGUITO I TEST D^u e Cellano SENZA AVER PRIMA BIPPATO: "AGGIUNGI ELENCO" E "INVIA LISTA DI LAVORO" .

Dopo aver inserito tutti i dati inerenti al test che vuole eseguire, l' analista procederà all' inserimento dei dati relativi al campione in analisi:

- Evidenziare la voce NUOVO DONATORE

Compare una finestra dove vanno inseriti:

- Alla voce TIPO CAMPIONE selezionare CENT BLOOD
- Alla voce DONATORE con la pistola bippare il barcode della/le provetta/e in esame, e il controllo positivo (Donatore conosciuto Du POS)
- Bippare il campione del Controllo Positivo
- Bippare l'eventuale campione del Controllo Negativo
- Confermare con OK
- Selezionare AGGIUNGI ELENCO
- Selezionare INVIA LISTA DI LAVORO
- Selezionare ESCI
- Caricare le provette a bordo
- Al termine effettuare lavaggio dello strumento: selezionare
- Manutenzione
- RISCIACQUO.

6.6 ESECUZIONE DEI CONTROLLI DI QUALITA' (CQ) SU INNOVA I, II, III, IV

- Estrarre dal frigorifero del settore Prove Crociate il rack dedicato che contiene le 4 provette numerate da 1 a 4: Ortho CQ Confidence™ WB (TCI NEG, TCI POS, gruppo A POS, B NEG)
- Controllare la scadenza
- Lasciarli 10 minuti a temperatura ambiente
- Centrifugare a 3500 RPM per 3 minuti
- Definirli con la seguente modalità:
- Selezionare il quadrato verde **CAMPIONI**
- Selezionare la freccetta verde posta al centro della pagina denominata **REGISTRA/CARICA**
- Nella pagina che appare selezionare con un flag verde la voce :**CONTROLLO**
- **In PROFILO** selezionare : **C.Q. TCI**
- **In TIPO CAMPIONE** selezionare : **SERUM**
- **In CAMPIONE :** bippare il barcode della provetta **TCI NEG (provetta 1)**
- Selezionare : **ok.** Il campione e il relativo test abbinato passa nella finestra "LISTA NUOVI CAMPIONI/CONTROLLI".
- Rimanendo sempre nella stessa pagina:
- **In CAMPIONE :** bippare il barcode della provetta **TCI POS (provetta 2)**
- Selezionare : **ok.**
- Cliccare **INVIA LISTA DI LAVORO**
- Rimanendo sempre nella stessa pagina, **In PROFILO** selezionare : **CQ GRUPPO PAZIENTE**
- **In TIPO CAMPIONE** selezionare : **CENTBLOOD**
- **In CAMPIONE :** bippare il barcode della provetta **GRUPPO A POS/TCIE (provetta 3)**
- Selezionare : **ok.** Il campione e il relativo test abbinato passa nella finestra "LISTA NUOVI CAMPIONI/CONTROLLI".
- Rimanendo sempre nella stessa pagina:
- **In CAMPIONE :** bippare il barcode della provetta **GRUPPO B NEG(provetta 4)**
- Selezionare : **ok.**
- Cliccare **INVIA LISTA DI LAVORO**
- Cliccare **ESCI**
- Aprire lo sportello dei campioni e caricare il rack dei CQ sullo strumento.
- A processazione ultimata il laureato del settore verifica i risultati
- Procedere alla stampa: selezionare da LISTA DI LAVORO la voce STAMPA
- Selezionare STAMPA
- Firmare il report e archiviarlo

6.7 CONTROLLI E MANUTENZIONI SU STRUMENTO AUTOVUE INNOVA

La verifica dello stato delle manutenzioni e la loro esecuzione è gestita dal software dell' Innova pertanto l'analista deve procedere all'accensione dello strumento (6.2) accedere al modulo " MANUTENZIONE" , dove apparirà l' elenco delle manutenzioni.
Lo stato di ogni manutenzione viene evidenziato da diverse colorazioni:

- Bollino VERDE: la manutenzione è stata eseguita
- Bollino ROSSO: manutenzione SCADUTA
- Bollino GIALLO: si ha un periodo di tolleranza per eseguire la manutenzione.

In Tab. 1 vengono elencate le manutenzioni

Tab. 1

TIPO DI MANUTENZIONE	SCADENZA	COMPETENZE
Decontaminazione puntale Svuotamento contenitore rifiuti liquidi	**giornaliera**	Tecnico di Laboratorio
Pulizia dello strumento Decontaminazione circuiti dei fluidi CQ AutoReader	**settimanale**	Tecnico di Laboratorio
CQ del volume pipetta	**Semestrale** (inoltre tale attività deve essere eseguita ogni qual volta viene sostituita la tubazione o il puntale della pipetta)	Tecnico esterno O.C.D.
CQ posizione pipettatore	**Straordinaria** (se lo strumento da errore: "puntale della pipetta posizionato non correttamente")	Tecnico di Laboratorio
Sostituzione puntale della pipetta	Straordinaria (tale manutenzione deve essere eseguita se la pipetta è danneggiata o otturata)	Tecnico di Laboratorio
Procedura di sostituzione lampade	**Straordinaria** (eseguire se il CQ del lettore automatico **non** è superato)	Tecnico esterno O.C.D.
Sostituzione filtro dell' aria	Straordinaria (eseguire se il filtro è sporco)	Tecnico esterno O.C.D.

6.7.1 MANUTENZIONE GIORNALIERA

- **DECONTAMINAZIONE DEL PUNTALE**

Dopo aver acceso lo strumento e aver atteso lo stato di modalità operativa ROUTINE, evidenziata di colore VERDE, selezionare sul monitor la voce:

- MANUTENZIONE
- DECONTAMINAZIONE PUNTALE
- ESEGUI

  La procedura è automatica e permette di eseguire sia la decontaminazione interna ed esterna del puntale sia la decontaminazione della stazione di lavaggio con soluzione di NaOH allo 0.1%N.

Al termine della manutenzione, sullo schermo, viene visualizzato il rapporto che indica l' esito della procedura. In caso di esito non conforme ripetere la manutenzione.

ATTENZIONE : Prima di procedere all' accensione dello strumento accertarsi che il flaconcino contenente la soluzione di NaOH 0.1N sia presente sullo strumento e contenga la soluzione decontaminante in quantità sufficiente.

- **SVUOTAMENTO DEL CONTENITORE DEI RIFIUTI LIQUIDI**

ESTRARRE LE CANNULE DAL CONTENITORE DEI RIFIUTI LIQUIDI.
ASCIUGARE LE CANNULE CON CARTA ASSORBENTE IMBEVUTA DI ALCOOL ISOPROPILICO AL 70%.
ELIMINARE I RIFIUTI SEGUENDO LE DIRETTIVE DI SMALTIMENTO DEI RIFIUTI LIQUIDI DA MATERIALE BIOLOGICO SECONDO IL "MANUALE AD USO DEGLI OPERATORI SANITARI" PER RIFIUTI OSPEDALIERI DELL' AZIENDA OSPEDALIERA DI PARMA VEDI PARAGRAFI INERENTI AI RIFIUTI SANITARI PERICOLOSI A RISCHIO INFETTIVO.

6.7.2 MANUTENZIONE SETTIMANALE

PULIZIA DELLO STRUMENTO

Dopo aver acceso lo strumento e aver atteso lo stato di modalità operativa ROUTINE, evidenziata di colore VERDE, selezionare sul monitor la voce:

- MANUTENZIONE
- PULIZIA STRUMENTO
- ESEGUI

In questa fase compare una mascherina dove viene richiesto che di RIMUOVERE:

- i campioni dallo strumento
- i rack reagenti
- la piastra di diluizione
- le Biocard dal CASUNCA
- svuotare il cestino dei rifiuti

Terminate le operazioni sopra elencate dare il comando CONTINUA.
Lo strumento verifica che le operazioni richieste siano state eseguite correttamente quindi procedere con al pulizia con un panno/garza imbevuto di alcool isopropilico al 70% di tutti i componenti richiesti dallo strumento.
Dopo aver eseguito le operazioni elencate selezionare ciascuna delle voci dell' elenco a video, infine selezionare la voce CONVALIDA.
Al termine della manutenzione, sullo schermo, viene visualizzato il rapporto che indica l' esito della procedura selezionare la voce ESCI. In caso di esito non conforme ripetere la manutenzione.

DECONTAMINAZIONE DEI CIRCUITI DEI FLUIDI

Dopo aver acceso lo strumento e aver atteso lo stato di modalità operativa ROUTINE, evidenziata di colore VERDE, selezionare sul monitor la voce:

- MANUTENZIONE
- DECONTAMINAZIONE CIRCUITI DEI FLUIDI
- ESEGUI

FASE 1-DECONTAMINAZIONE:
riempire il contenitore della soluzione fisiologica con 1* litro di NaOH 0.1 N introdurre le cannule della SOLUZIONE FISIOLOGICA e dell' ACQUA DISTILLATA, previa asciugatura con carta assorbente, sfiorare il pulsante CONTINUA.

Contemporaneamente all' esecuzione della decontaminazione dei circuiti eseguire la decontaminazione del contenitore dell' ACQUA DISTILLATA: riempire il contenitore con 1 litro di sol. NaOH 0.1 N e risciacquare abbondantemente con acqua di rete è importante che l' ultimo risciacquo venga eseguito con acqua distillata, quindi riempire il contenitore con acqua distillata.

FASE 2- RISCIACQUO:
al termine della fase 1 procedere con il risciacquo delle cannule: posizionare le cannule nel contenitore dell' ACQUA DISTILLATA, previa asciugatura con carta assorbente, sfiorare il pulsante CONTINUA.
Durante lo svolgimento della FASE 2 è possibile procedere al risciacquo del contenitore della sol. Fisiologica dalla sol. di NaOH quindi procedere al riempimento con fisiologica.

Terminata la fase di risciacquo riporre le cannule nei rispettivi contenitori sfiorare il pulsante CONTINUA.
Al termine della manutenzione, sullo schermo, viene visualizzato il rapporto che indica l' esito di conformita' della procedura selezionare la voce ESCI. In caso di esito non conforme ripetere la manutenzione.

*È IMPORTANTE CHE LE CANNULE SIANO PERFETTAMENTE IMMERSE NELLA SOLUZIONE DI NaOH/ ACQUA DISTILLATA IN MODO TALE DA ASSICURARSI CHE QUESTE ALL' ATTO DELLA DECONTAMINAZIONE/ RISCIACQUO ASPIRINO IL QUANTITATIVO NECESSARIO SENZA CHE SI FORMINO BOLLE D' ARIA ALL' INTERNO DEI CIRCUITI CHE POTREBBERO COMPROMETTERE L' ESITO DELLA DECONTAMINAZIONE/ RISCIACQUO.

CONTROLLO QUALITA' DEL LETTORE AUTOMATICO (AutoReader)

Dopo aver acceso lo strumento e aver atteso lo stato di modalità operativa ROUTINE, evidenziata di colore VERDE, selezionare sul monitor la voce:

- MANUTENZIONE
- CQ AUTOREADER
- ESEGUI

Estrarre la cassetta di taratura dal contenitore, accertarsi che sia pulita, in caso contrario provvedere alla rimozione di eventuali residui con un panno morbido.
Aprire il COPERCHIO PRINCIPALE dello strumento e inserire la cassetta in posizione 12 del CASUNCA avendo cura che l' etichetta bianca presente sulla cassetta sia rivolta verso sinistra rispetto all'analista. Posizionata la biocard provvedere alla chiusura del coperchi principare e sfiorare il pulsante CONTINUA.

6.7.3 SMALTIMENTO RIFIUTI

Al termine delle manutenzioni, dopo avere verificato l' esito di conformita' dei rapporti, i rifiuti vengono eliminati come rifiuti speciali nell'apposito contenitore Riferimento"MANUALE AD USO DEGLI OPERATORI SANITARI" per rifiuti Ospedalieri dell' Azienda Ospedaliera di Parma vedi paragrafi inerenti ai rifiuti sanitari pericolosi a rischio infettivo.

6.7.4 REGISTRAZIONE DELLE ATTIVITA'

Ciascuna delle attività di manutenzione deve essere registrata nelle schede strumenti relative in riferimento a quanto riportato in Istruzione Operativa Cod. I.O./07, vedi Allegato 1,2,3,4 per controlli e manutenzioni ordinarie, e Allegato 5,6,7,8 per manutenzioni straordinarie.

6.8 RICERCA E IDENTIFICAZIONE DELLE AGGLUTININE A FRIGORE

Le *agglutinine a frigore* sono autoanticorpi che, a basso titolo (non oltre 1/32 –1/64) e a range termico ristretto (non oltre la temperatura di laboratorio), non rivestono carattere patologico, ma se sono presenti a titoli elevati e ad escursione termica ampia fino ad agire a temperatura corporea sono da considerarsi patologiche.
Pertanto l'individuazione della specificità degli autoanticorpi freddi può avere valore nella gestione del paziente e nell'inquadrare la malattia che sta alla base delle forme secondarie (mononucleosi infettiva) o infezione da micoplasmi.

Scopo della presente istruzione di lavoro e quello di evidenziare la presenza delle agglutinine a frigore patologiche e verso quali determinanti gruppo-ematici sono dirette.
Verificare la significatività dell'anticorpo eventualmente riscontrato mediante titolazione, che si rende necessaria nel caso in cui si riscontri una positività ≥ 1 + → 4+ .

MATERIALI OCCORRENTI:

1) Schedine Ortho **NEUTRAL** Biovue System
2) N° 1 provetta paziente da siero (tappo rosso o beige), N°1 provetta paziente da emocromo (tappo viola). **I campioni devono essere prelevati e conservati in condizionamento termico, a 37°C, fino all'arrivo, nel più breve tempo possibile, presso il SIMT.**
3) Provette monouso
4) Pipette calibrate
5) S.F.
6) Emazie di neonato I-neg Diamed
7) Surgiscreen
8) Incubatore Ortho per schedine
9) Centrifuga Ortho per schedine
10) Bagnomaria a 37°C
11) Puntali

PREPARAZIONE SIERO DEL PAZIENTE

Fare coagulare il campione (provetta tappo rosso) a + 37°C a bagnomaria per circa un'ora.
Dopo aver verificato la separazione emazie- siero non occorre centrifugare il campione ma il siero deve essere immediatamente utilizzato o, se l'analisi viene eseguita il giorno successivo, separato e conservato a + 4°C.

PREPARAZIONE EMAZIE DEL PAZIENTE (A)

Le emazie del paziente si preparano al momento (o il giorno successivo) diluendole in S.F. al 3-5%.

PREPARAZIONE EMAZIE NEONATO (N)

Sono pronte all'uso.

PREPARAZIONE EMAZIE DONATORE (S)

Utilizzare il Surgiscreeen e unire in una provettina 5 gocce di S1, 5gocce di S2 ,5 gocce di S3.

PREPARAZIONE SCHEDINE
Utilizzare **3** schedine **NEUTRAL** (**4°C-20°C-37°C**). La schedina che dovrà essere incubata a +4°C viene prelevata dal frigorifero posto nella stanza delle prove crociate. Su ogni schedina identificare 3 colonnine con il nome del paziente e contrassegnare ogni singola colonna col tipo di emazie : **N - S - A**

ESECUZIONE

- Pipettare in ogni colonnina 10 µl di ogni tipo di emazia
- Aggiungere 40 µl di siero del paziente
- Incubare la schedina a 4°C in frigorifero per 30 minuti, la schedina a 37°C nell'incubatore per 15 minuti, la schedina a 20°C a temperatura ambiente per 30 minuti
- Centrifugare
- Leggere

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

In caso di **REAZIONE POSITIVA** le emazie, agglutinate, si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione forte 4+) o comunque all'interno del mezzo con differente score (3+,2+,1+,0.5+) .
In caso di **REAZIONE NEGATIVA**, le emazie, libere, precipiteranno sul fondo del pozzetto della schedina dove formeranno un bottone.
La seguente tabella sintetizza i possibili risultati e le conseguenti interpretazioni

Emazia test	Anti-I	Anti-i	Anti-H	Anti-HI	Anti-Pr
0 neonato (i)	0/2+	3+	4+	2+	4+
0 adulto (I)	4+	0/1+	4+	4+	4+
autologhe	4+	0/1+	4+	4+	4+

- Anti-H e anti-HI sono presenti soprattutto in soggetti A_1 eA_1B
- La specificità più frequente è quella anti-I, ma possono comparire anche quelle anti-i soprattutto in casi di MEA da autoanticorpi freddi in corso di mononucleosi infettiva e anti-Pr (antigeni presenti su tutte le emazia umane, con uguale espressività in neonati e adulti, che sono inattivati dall'azione della papaina e da altre proteasi, da cui la sigla)
- Alcuni esempi anti-I mostrano reattività con emazia a forte espressività H (come emazia 0 o A_2), da cui la più corretta interpretazione come anti-IH

Ogni volta viene riscontrata una positività superiore a 1+, occorre sempre allestire la titolazione (vedi istruzione di lavoro "Titolazione agglutinine a frigore")

6.9 TITOLAZIONE AGGLUTININE A FRIGORE

Quantificare mediante uno score rappresentato da una titolazione, in raddoppio crescente, la quantità di agglutinine presenti a quella/e determinata/e temperatura/e con positività significativa nella fase di ricerca e di identificazione (I.L:"Ricerca e identificazione agglutinine a frigore").
Le agglutinine sono anticorpi freddi in genere presenti a basso titolo (non oltre 1/32- 1/64) e a range termico ristretto (18- 20°C). Si applica a tutti i pazienti nei quali la ricerca ed identificazione eseguita presso il nostro Laboratorio di Immunoematologia ha dato una positività superiore a **+1** (I.L:"Ricerca e identificazione agglutinine a frigore")

MATERIALI OCCORRENTI
1) Schedine Ortho **NEUTRAL** Biovue System
2) Siero paziente da testare
3) Provette
4) Pipette calibrate
5) Puntali
6) Soluzione Fisiologica
7) Incubatore Ortho per schedine
8) Centrifuga Ortho per schedine

ESECUZIONE
Per eseguire la titolazione si deve :
1) Preparare il siero del paziente (I.L:"Ricerca e identificazione agglutinine a frigore")
2) Allestire le diluizioni scalari del siero del paziente nel seguente modo (fig.1) :
    - disporre in serie 12 provette da laboratorio e su ciascuna scrivere la diluizione in raddoppio partendo da 1:2 fino a 1:4096 che coincide con l'ultima provetta
    - in ogni provetta mettere 300 µl di Soluzione Fisiologica e solo nella 1° provetta mettere 300 µl di siero del paziente precedentemente preparato
    - scuotere un po' la 1° provetta per miscelare la soluzione e da questa prelevare 300 µl e passarli nella 2° provetta, scuoterla leggermente, poi da questa prelevare 300 µl e passarli nella 4° provetta e così via fino all'ultima.

Fig.1

Titolo	1/1	1/2	1/4	1/8	1/16	1/32	1/64….
S.F.	300 µl+	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl	300 µl
Siero	300 µl						

3) Allestire **2** schedine **NEUTRAL** della ditta Ortho contrassegnando ciascuna colonnina in sequenza con una diluizione in raddoppio partendo da 1/2, 1/4 ,1/8, 1/16, 1/32, 1/64, 1/128, 1/256,1/512,1/1028, 1/2048, 1/4096.
4) Da ogni provetta con le diluizioni a scalare prelevare **40 µl** e dispensarle nella corrispettiva colonna della schedina (es. prelevare **40 µl** dalla provetta 1/2 e dispensarla nella colonna 1/2

della schedina, prelevare **40 µl** dalla provetta 1/4 e dispensarla nella colonna 1/4 e così di seguito).

5) In ogni colonna dispensare **10 µl** di emazie test (quelle verso cui si è riscontrata la positività: emazie adulto ,oppure emazie di neonato o le emazie autologhe del paziente.
6) Porre la schedina alla stessa temperatura di reazione (a 4°C oppure 20°C o a 37°C) in cui si era riscontrata la positività nella fase di ricerca agglutinine per un tempo di almeno 30 minuti. In taluni casi può essere necessario aumentare il tempo di incubazione a 45 minuti soprattutto se la positività era stata riscontrata a 37°C.
7) Centrifugare per 5 minuti
8) Leggere il risultato

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Individuare la diluizione in cui non e' più visibile l'agglutinazione **(end-point)** mediante la valutazione dello score.

6.10 EPN

Lo scopo di questa istruzione di lavoro è di descrivere le azioni che devono essere compiute in caso di richiesta di Emoglobinuria Parossistica Notturna (EPN).
L'emoglobinuria parossistica notturna (PNH) o sindrome di Marchiafava –Micheli è caratterizzata da emolisi intravascolare intermittente dovuta all'ipersensibilità degli eritrociti nei confronti dell'azione emolitica del complemento (1,2).
Questa malattia è riconducibile alla mancanza (o ad una espressione carente) di proteine, ad es. Decay Acceleratine Factor CD 55 (DAF); Proteina legante il C8 (C8bp) e CD 59, Membrane Inhibitor of Reactive Lysis (MIRL).
Tale test viene richiesto dai reparti e dai medici di base.

METODO DIAMED su colonna (procedura manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

Schedine Diamed specifiche ID-PNH a temperara ambiente;
Antisieri ID-PNH test REAGENTS (anti –MIRL, anti-DAF e PNH-ctl) a +4°C;
Campione di sangue mescolato con anticoagulante (citrato, EDTA, Eparina, CPD-A);
Diluente 2 DIAMED (Liss modificato per la preparazione delle sospensioni eritrocitarie);
Incubatore 37°C per schedine Diamed;
Centrifuga dedicata per schedine Diamed.

PROCEDIMENTO

- Portare gli antisieri a temperatura ambiente.
- Preparare una sospensione allo 0.8% di emazie del paziente diluendo 10 µl di sangue in 1 ml di Diluente 2 (pipettare 2 volte col dispensatore automatico. Ogni pipettata deve essere impostata su 500 µl).
- Identificare con il cognome e nome del paziente le tre colonnine di una schedina Diamed "ID-PNH" e dispensare 50 µl di emazie in sospensione in ciascuna colonnina.
- Dispensare poi 50 µl dei 3 antisieri (Monoclonale linea cellulare MEM 43, anti-MIRL; Monoclinale linea cellulare BRIC 216, anti –DAF; Controllo negative, PNH-ctl), nelle corrispondenti colonnine. Il PNH-CTL è il controllo negativo e deve risultare negativo.
- Incubare la schedina per 15 minuti a 37° C nell'incubatore DIAMED, dopodiché centrifugare e leggere il risultato.

INTERPRETAZIONE:
Reazioni positive da +++ a ++++ indicano una popolazione di eritrociti normale con la presenza dei corrispondenti antigeni DAF e MIRL.
Ciò denota che il paziente non è affetto da EPN.
La colonnina del controllo(ID – PNH ctl) deve dare reazione negativa.

Le reazioni negative indicano l'assenza dei corrispondenti antigeni DAF e MIRL e denotano che il paziente è positivo per EPN.
Una doppia popolazione (presenza di eritrociti normali assieme ad eritrociti con EPN) è indice di una debole positività delle schedine.

6.11 TITOLAZIONE ANTICORPI ANTI A / B NATURALI

Si applica ogni volta in cui si debbano ricercare nel siero del paziente anticorpi di classe IgM naturali anti-A e/o anti-B per i quali **NON** si deve **NEUTRALIZZARE** il siero.

MATERIALI OCCORRENTI:

1. Campione di siero da testare
2. Provette perfettamente pulite o monouso
3. Portaprovette
4. Schedine Ortho Neutral
5. Pipette calibrate
6. Puntali monouso
7. Soluzione fisiologica tamponata a pH 7,3
8. Centrifuga per provette Heraeus Sephatech Megafuge 1.0
9. Emazie test A1 e/o B (Affimagen- Ortho) o quelle preparate nel nostro laboratorio ogni settimana

PROCEDURA:

- Centrifugare il campione a 3000 giri per 5 minuti
- Preparare a parte 12 provettine contrassegnate con il nome del paziente e con i valori della diluizione scalare che si vuole eseguire: **2, 4, 8, 16, 32, 64, 128, 256, 512, 1024, 2048, 4096…**
- Pipettare in ogni provettina **200 µl** di soluzione fisiologica
- Aggiungere **200 µl** di siero campione non neutralizzato nella prima provettina (2), mescolare e trasportare **200 µl** di miscela siero-fisiologica nella seconda provettina.
- Continuare così fino all’ultima provettina.
- Gettare via gli ultimi **200 µl** che rimangono nel puntale
- Contrassegnare 12 colonnine (quante sono le diluizioni già preparate) di una schedina Ortho Neutral, col nome del paziente e i valori delle diluizioni per anti-A e/o anti-B
- Pipettare **40 µl** di siero precedentemente diluito nelle rispettive colonnine
- Aggiungere **10 µl** di emazie test A1 e/o B in ogni colonnina
- Incubare a temperatura ambiente per 30 minuti
- Centrifugare
- Leggere

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI:

Mediante la valutazione dello score si può individuare la diluizione in cui non è più visibile l’agglutinazione (end- point).

6.12 SCREENING NEL TRAPIANTO DI RENE DA DONATORE A/B/0 INCOMPATIBILE

PROTOCOLLO PER LO SCREENING SUL DONATORE DI RENE ABOi

Al **1° Accesso** eseguire sulla provetta in EDTA (tappo viola) del Donatore di rene i seguenti esami:

- *Gruppo sanguigno indiretto (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Gruppo sanguigno diretto (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Fenotipo Rh (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Eventuale tipizzazione anti A1 con lectina (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCI (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCDC (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCDG (Rif. Istruzioni di lavoro)*

PROTOCOLLO PER LO SCREENING SUL RICEVENTE IL TRAPIANTO DI RENE ABOi

Al **1° Accesso** eseguire sulla provetta in EDTA (tappo viola) del Ricevente il trapianto di rene i seguenti esami:

- *Gruppo sanguigno indiretto (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Gruppo sanguigno diretto (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Fenotipo Rh (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Eventuale tipizzazione anti A1 con lectina (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCI (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCDC (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *TCDG (Rif. Istruzioni di lavoro)*
- *Titolo IgM (anticorpi naturali) contro emazie A o B del donatore*
- *Titolo IgM (anticorpi naturali) contro emazie A o B del commercio dello stesso gruppo del donatore*
- *Titolo IgG (anticorpi immuni) contro emazie A o B del donatore*
- *Titolo IgG (anticorpi immuni)contro emazie A o B del commercio dello stesso gruppo del donatore*

A) DETERMINAZIONE DEL SOTTOGRUPPO A MEDIANTE LECTINA ANTI A1

La lectina è una fitoemoagglutinina estratta dai semi di Dholichos Biflorus che agglutina gli eritrociti umani del sottogruppo A1 e A1B ma non quelli A2, A2B e O. Serve quindi per determinare la presenza dell'antigene A1 sulle emazie in esame.

TEST IN PROVETTA
Materiali

- Lectina anti A1 (Ditta Ortho Diagnostics)
- 3 provettine
- Un campione ematico in EDTA del paziente
- Sospensione di eritrociti standard A1 (AFFIRMAGEN o AFFIRMAGEN 4 – Ditta Ortho Diagnostics)
- Sospensione di eritrociti standard A2 (AFFIRMAGEN o AFFIRMAGEN 4 – Ditta Ortho Diagnostics)

METODICA

- *Etichettare le 3 provettine : PAZIENTE, Controllo POSITIVO, Controllo NEGATIVO*
- *Preparare una sospensione di eritrociti in esame al 3 – 5% in soluzione salina isotonica*
- *Aggiungere ad ogni provetta 1 gt (50 µl) di lectina anti A1*
- *Aggiungere 1 gt (50 µl) di eritrociti in esame nella provetta PAZIENTE*
- *Aggiungere 1 gt (50 µl) di eritrociti A1 alla provetta del Controllo POSITIVO*
- *Aggiungere 1 gt (50 µl) di eritrociti A2 alla provetta del Controllo NEGATIVO*
- *Mescolare bene, centrifugare a 1000 rpm per 1 minuto e leggere*

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E TEST DI CONTROLLO

La presenza dell'antigene A1 darà agglutinazione nella provetta test: la mancata agglutinazione indicherà la sua assenza e sarà interpretato come A2.
Fondamentale il corretto risultato dei controlli POSITIVO (con agglutinazione presente) e NEGATIVO (con agglutinazione assente).

NB : Una determinazione rapida si può fare su piastra.

1) *Contrassegnare 3 pozzetti : 1=Paziente ; 2=K Pos ; 3=K Neg*
2) *Aggiungere ai 3 pozzetti 1 gt (50 µl) di Lectina anti- A1*
3) *Aggiungere 1 gt (50 µl) di emazie del Paziente nel pozzetto corrispondente*
4) *Aggiungere 1 gt (50 µl) di eritrociti A1 nel pozzetto K Pos*
5) *Aggiungereg 1gt (50 µl) di eritrociti A2 nel pozzetto K Neg*

Agitare manualmente sull'agglutinoscopio e interpretare il risultato .

B) TITOLAZIONE ANTICORPI IgM (NATURALI) ANTI A / ANTI B

Si applica ogni volta in cui si debbono ricercare nel siero del paziente ricevente il trapianto di rene ABOi, gli anticorpi di classe IgM naturali anti A e/o B per i quali ***NON*** *si deve* ***NEUTRALIZZARE*** *il siero.*

MATERIALI OCCORRENTI

1) *Campione di siero da testare*
2) *Provette perfettamente pulite e monouso*
3) *Portaprovette*
4) *Schedine Ortho NEUTRAL (Ortho Diagnostics)(in dotazione al SIMT)*
5) *Pipette calibrate*
6) *Puntali monouso*
7) *Soluzione fisiologica tamponata a pH 7,3*
8) *Centrifuga per provette Heraeus Sepatech Megafuge 1.0*
9) *Centrifuga per schedine della Ditta Ortho*
10) *Emazie Test standard A1, A2 e/o B (AFFIRMAGEN Ortho)(in dotazione al SIMT)*
11) *Emazie del donatore al 3-5% in soluzione fisiologica*

METODICA

Centrifugare il campione a 3000 rpm per 5 minuti.
Allestire 2 titolazioni in parallelo:

- *Titolazione che utilizza siero o plasma del paziente in esame* ***contro emazie test standard*** *dello stesso gruppo del donatore di rene*
- *Titolazione che utilizza siero o plasma del paziente in esame contro* ***emazie del donatore di rene***

Per ogni titolazione:

- *Preparare a parte 12 provettine contrassegnate con il nome del paziente e con i valori della diluizione scalare a "raddoppio"che si vuole eseguire:* ***2 , 4, 8, 16, 32, 64, 128 ,256, 512, 1024, 2048.....***
- *Pipettare in ogni provettina 200 µl di Soluzione Fisiologica*
- *Aggiungere 200 µl di siero campione* ***NON NEUTRALIZZATO*** *nella prima Provettina contrassegnata 2, mescolare e trasportare 200 µl di miscela siero-fisiologica nella seconda provettina.*
- *Continuare così fino all'ultima provettina.*
- *Gettare via gli ultimi 200 µl che rimangono nel puntale.*
- *Contrassegnare* ***n° 2 serie*** *di 12 colonnine (o quante sono le diluizioni già preparate) di una schedina Ortho NEUTRAL (ogni schedina ha 6 colonnine), con il nome del paziente e i valori delle diluizioni per anti A e/o B.* ***Nella prima serie specificare che si tratta delle emazie test del commercio, mentre nelle seconde delle emazie del donatore****.*
- *Pipettare 40 µl di siero precedentemente diluito nelle rispettive colonnine.*
- *Aggiungere in ogni colonnina 10 µl di emazie test A1 e/o B (Affirmagen Ortho) nella nella prima serie e invece le emazie del donatore diluite al 3-5% nella seconda serie.*
- *Incubare a Temperatura Ambiente per 30 minuti*

- *Centrifugare*
- *Leggere il risultato.*

PREPARAZIONE DELLE EMAZIE DEL DONATORE

- *Lavare le emazie per 3 volte con Soluzione Fisiologica*
  - *Prendere 40 µl di cellule paccate e aggiungere 960 µl di Soluzione Fisiologica (4%)*
  - *Per le emazie standard (Affirmagen) utilizzarle come sono.(3-5%)*

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Mediante la valutazione dello score si può individuare la diluizione in cui l'agglutinazione è a +1 weak (end point).

C) TRATTAMENTO DEL SIERO/PLASMA CON DITIOTREITOLO (DTT) PER NEUTRALIZZARE GLI ANTICORPI NATURALI

Serve per differenziare e neutralizzare nel siero in esame l'attività anticorpale gruppoematica IgM dalle IgG in quanto il DTT rompe i ponti sulfidrilici delle IgM, ma non delle IgG e IgA.
Notoriamente le IgM sono composte da pentameri, cioè da 5 subunità immunoglobuliniche disposte a raggiera e collegate fra di loro da ponti disolfurici.
Ciascuna subunità consiste di due catene pesanti (catene µ) e di due catene leggere (catene k o λ), anch'esse collegate fra loro tramite ponti disolfurici.
I ponti disolfurici fra le subunità sono sensibili al trattamento con prodotti tiolici, mentre quelli intracatene non lo sono.
Un trattamento con Ditiotreitolo (DTT) rompe le catene fra le subunità e riduce il pentamero IgM a 5 monomeri (questi assomigliano alle IgG ma non sono uguali) e fa perdere all'immunoglobulina M ogni sua capacità funzionale (mentre non altera quelle delle IgG).

MATERIALI

- *DTT*
- *500 µl di siero/plasma in esame*
- *2 provettine vuote perfettamente pulite e monouso*

METODICA

- *Etichettare le 2 provettine su cui va scritto rispettivamente nell'una DTT e nell'altra CONTROLLO*
- *Nella provettina con scritto DTT aggiungere 500 µl di siero / plasma + 500 µl di DTT*
- *Nella provetta con scritto CONTROLLO aggiungere 500 µl di siero/plasma + 500 µl di Soluzione fisiologica*
- *Mescolare accuratamente e mettere in bagnomaria a 37°C per 20-60 min*

- *Testare l'attività anticorpale contro pertinenti emazie standard del commercio in entrambe le provette predisponendo opportune diluizioni in raddoppio (es. 1/32)*

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI E TEST DI CONTROLLO

1) *Se l'attività anticorpale del siero in esame è dovuta esclusivamente a IgM, il siero/plasma della provetta DTT non reagirà più con le emazie test (e nello stesso modo si comporteranno le sue diluizioni) perchè sono state distrutte le IgM con la neutralizzazione.*
2) *Se, al contrario,l'attività anticorpale resterà inalterata e titolabile ciò è dovuto alle IgG poiché queste non vengono distrutte. Potrebbe avvenire che sia la diluizione con DTT che con quella con fisiologica diano una risposta positiva; ciò può essere messo in relazione alla presenza contestuale di IgM e di IgG, ma potrebbe indicare una inattivazione delle IgM soltanto parziale. In questo caso è necessario ripetere il procedimento per controllo.*

D) TITOLAZIONE ANTICORPI IgG IMMUNI ANTI A o ANTI B

Per poter procedere alla titolazione degli anticorpi immuni anti-A e/o anti-B ***SI DEVE NEUTRALIZZARE*** *il siero/plasma del paziente.(Rif. Istruzione di lavoro precedente)*

METODICA CON GEL CARD DIAMED

MATERIALI OCCORRENTI

- *Campione di siero/plasma del ricevente da testare*
- *SCHEDINA DIAMED con siero di Coombs con anticorpo monoclonale anti-IgG rabbit (DiaMed ID, Coombs anti-IgG)*
- *Provette perfettamente pulite e monouso*
- *Portaprovette*
- *Pipette calibrate*
- *Puntali monouso*
- *Soluzione 0,01 M di ditiotreitolo (DTT) (pronta per l'uso)*
- *Emazie test: A1 e/o B (Affirmagen – Ortho Diagnostics)*
- *Campione ematico del donatore in EDTA (meglio 2 provette)*
- *Bagnomaria a 37°C*
- *Centrifuga per provette Heraeus Sephatech Megafuge 1.0*
- *Centrifuga per schedine DIAMED ID CENTRIFUGE 24S*

PREPARAZIONE DELLE EMAZIE DEL DONATORE

- *Lavare le emazie in "DILUENTE 2" per 3 volte*

- *Prendere 10 µl di cellule "paccate" e aggiungere 1 ml di "Diluente 2" (si ottiene una diluizione delle emazie del donatore all'1%) (Durata delle emazie in Diluente 2: 24 h a 4°C). Il campione ematico di base del donatore può essere conservato a +4°C per 14 giorni*
- *Per le emazie standard (Affirmagen): prenderne 1 aliquota ,centrifugare,buttare il supernatante e risospendere in 1 ml di "Diluent 2"*

PROCEDURA PER LA NEUTRALIZZAZIONE (Rif. Istruzione di lavoro precedente)
La miscela di 1 parte di siero/plasma + 1 parte uguale di DTT porta a una soluzione diluita 1:2 che diventa il siero/plasma base per le diluizioni che verranno eseguite a raddoppio.

METODICA DELLA TITOLAZIONE

Allestire 2 serie di titolazioni in parallelo:

- *Una titolazione che utilizza siero del ricevente in esame* ***contro emazie standard*** *dello stesso gruppo del donatore di rene (precedentemente preparate)*
- *Una titolazione che utilizza siero del ricevente in esame* ***contro le emazie del donatore*** *di rene (precedentemente preparate)*

1. *DISPORRE LA SERIE DI PROVETTE*
   Per eseguire la titolazione mettere in serie una fila di provette di plastica fino a dove si vuole far arrivare la diluizione (con su scritta la diluizione scalare), ricordando che la prima provetta della serie 1:2 sarà quella che contiene il siero/plasma neutralizzato e che per le diluizioni si dovrà iniziare dalla 2° provetta con su scritto 1:4.

2. *INIZIARE LE DISPENSAZIONI*
   - ***Pipettare 100 µl di DILUENTE 2*** *in ciascuna provettina titolata a partire da quella 1:4 e fino all'ultima*
   - ***Quimdi prendere 100 µl di siero/plasma neutralizzato*** *dalla provetta base (1:2) e metterli nella seconda provetta (1:4), miscelare, poi da questa prelevare 100 µl e metterli nella 3° provetta (1:8), miscelare, da questa prelevare altri 100 µl da mettere nella 4° (1:16) e così di seguito progressivamente fino all'ultima provetta. Poi gettare gli ultimi 100 µl che restano nel puntale. In tal modo si sono ottenute delle diluizioni progressive.*

3. *TRASFERIRE LE DILUIZIONI NELLE SCHEDINE DIAMED IgG*
   In ciascuna microcolonna della schedina DIAMED già precedentemente titolata, porre 50 µl di sospensione del donatore all'1% + 25 µl del siero/plasma diluito con la stessa titolazione della rispettiva provetta. Nelle microcolonne della serie con le emazie standard, procedere nello stesso modo.

4. *INCUBARE LE SCHEDINE PER 15 MINUTI A 37°C NELL'APPOSITO TERMOSTATO*

5. *CENTRIFUGARE LE SCHEDINE PER 10 MINUTI A 85 g NELL'APPOSITA CENTRIFUGA DIAMED*

6. *LEGGERE I RISULTATI*

INTERPRETAZIONE

Individuare come end-point la diluizione in cui l'agglutinazione è +1 weak e segnare il risultato.

Stoccaggio sieri paziente

Ad ogni titolazione stoccare a -20°C un campione di siero/plasma del paziente (non neutralizzato) che è stato utilizzato per la titolazione.

6.13 DETERMINAZIONE DEGLI ANTICORPI ANTI A1 IRREGOLARI

1. Allestire una provettina piccola contrassegnata col nome del paziente;
2. Dispensare due gocce di siero del paziente e una goccia di gruppo A-1;
3. Centrifugare a bassa velocità (1000 giri) per 1 minuto;
4. Leggere l'eventuale agglutinazione scuotendo la provettina sull'oscilloscopio;
5. Se la reazione è negativa incubare a 37°C per 30-60 minuti.
6. Al termine dell'incubazione lavare in Coombs e leggere.

6.14 TITOLAZIONE ANTI D

PRINCIPIO: Sono anticorpi di classe IgG, perché immuni, ma NON è necessario NEUTRALIZZARE perché non esistono gli anticorpi naturali relativi.

- Centrifugare la provetta del paziente (da siero) a 3000 giri per 5 minuti
- Preparare 12 provettine contrassegnate con nome paziente e i valori di diluizione scalare: 2,4,8,16,32,64,128,256,512,1024,2048,4096.
- In ogni provetta pipettare 200 µl di soluzione fisiologica
- Pipettare nella prima provetta 200 µl di siero del paziente, miscelare e trasferirne 200 µl nella seconda continuando così fino all'ultima.
- Preparare le corrispettive 12 colonnine di una schedina ORTHO IGG- C3D POLY contrassegnando sempre con nome paziente e diluizioni.
- Pipettare 40 µl di siero diluito nelle rispettive colonnine
- Aggiungere 10 µl di emazie del Panel A opportunamente scelte (D positive : R2R2)
- Incubare a 37 °c per 15' .
- Centrifugare e leggere

6.15 TITOLAZIONE ANTI C E ALTRI ANTICORPI ANTIERITROCITARI

PRINCIPIO: Sono anticorpi di classe IgG, perché immuni, ma NON è necessario NEUTRALIZZARE perché non esistono gli anticorpi naturali relativi.

1. Centrifugare la provetta del paziente (da siero) a 3000 giri per 5 minuti
2. Preparare 12 provettine contrassegnate con nome paziente e i valori di diluizione scalare: 2,4,8,16,32,64,128,256,512,1024,2048,4096.
3. In ogni provetta pipettare 200 µl di soluzione fisiologica
4. Pipettare nella prima provetta 200 µl di siero del paziente, miscelare e trasferirne 200 µl nella seconda continuando così fino all'ultima.
5. Preparare le corrispettive 12 colonnine di una schedina ORTHO IGG- C3D POLY contrassegnando sempre con nome paziente e diluizioni.
6. Pipettare 40   di siero diluito nelle rispettive colinnine
7. Aggiungere 10 µl di emazie del panel a o panel C non ficinato. Scegliere il boccetto che contiene l'antigene relativo all'anticorpo da titolare.
8. Incubare a 37 °C per 15' .
9. Centrifugare e leggere.

6.16 WARM. (Warm Autoantibody Removal Medium)

Principio e scopo del test:

La presenza nel siero di un paziente di autoanticorpi caldi, rilevati con il test di Coombs diretto positivo, può mascherare la presenza di un allo anticorpo inatteso e/o può interferire con le prove di compatibilità dando risultati inattendibili. Si deve procedere ad adsorbire questi autoanticorpi e le emazie più adatte allo scopo sono sicuramente le emazie del paziente, dalle quali però occorre rimuovere preventivamente gli autoanticorpi adesi.
Perciò le emazie del paziente vengono trattate con W.A.R.M: una soluzione di ditiotreitolo e papaina cisteina- attivata in tampone fosfato.
Le cellule del paziente così trattate sono incubate a 37°C con siero autologo.

Campioni richiesti:
4 provette da emocromo del paziente mantenute a temperatura, ambiente

Procedura: il test deve essere eseguito entro 48 ore dal prelievo. Oltre questo tempo il campione deve essere refrigerato a 1-10° C.

- Ricostituire una nuova fiala di WARM (Immucor Inc, USA) conservata a +4°C con **5** ml di acqua distillata fino a completo scioglimento del liofilo (circa 30 minuti a temperatura ambiente);
- Centrifugare le 4 provette a 3500 rpm per 5'. Separare il plasma in una provetta a temperatura. ambiente;
- Prelevare un volume di emazie paccate (in media 2 cc). Non è necessario lavare le cellule prima del trattamento;
- Aggiungere 2 volumi di WARM ricostituito (nel caso avessimo 1 cc di emazie dovremmo utilizzare 2 cc di WARM), miscelare bene e incubare a 37°C per 30 minuti;
- Al termine dell'incubazione centrifugare e lavare con soluzione fisiologica (3500 rpm per 1 minuto) per almeno tre volte, avendo cura di rimuovere più surnatante possibile ad ogni lavaggio;
- Eseguire a questo punto un TCD che dovrebbe risultare negativo
- Aggiungere quindi alle emazie lavate e trattate un ugual volume di plasma del paziente messo da parte precedentemente. Miscelare delicatamente per inversione e incubare per 30 minuti a 37°C;
- Centrifugare a 3500 RPM per 2 minuti la provetta per impaccare bene le emazie che verranno scartate. Raccogliere il plasma adsorbito in un'altra provetta;

E' possibile ora eseguire un test di Coombs indiretto sul plasma così trattato utilizzando un pannello a tre cellule Surgiscreen S1 S2 S3 , compreso un autocontrollo, in schedina senza bliss (Ortho Coombs) secondo le procedure usuali.

RISULTATI POSSIBILI:

S1 S2 S3 TUTTO POSITIVO: il trattamento WARM non è stato risolutivo, e dopo aver allestito comunque una prova di compatibilità secondo le modalità in uso, il medico del SIMT avvisa telefonicamente il reparto dell'esito delle analisi e concorda con i colleghi l'eventuale trasfusione se questa è irrinunciabile o un nuovo tentativo di autoadsorbimento utilizzando altre emazie del paziente già trattate e preventivamente accantonate e il plasma già sottoposto all'autoadsorbimento (ripartire dal punto 4).

S1 S2 S3 POSITIVO in una o due colonne: probabile presenza di un allo anticorpo da identificare con pannello a 11 cellule e dopo l'identificazione si procede all'allestimento della prova di compatibilità, assegnando concentrati eritrocitari privi dell'anticorpo identificato, fenotipo compatibili;
S1 S2 S3 NEGATIVO: il trattamento è riuscito,e quindi AlloAnticorpi assenti usare il plasma per la prova di compatibilità che verrà eseguita, secondo le usuali procedure, in schedina.

6.17 TCI

Il TCI ha lo scopo di individuare nel siero di tutti i pazienti, all'atto di ricevimento delle richiesta, la presenza di eventuali anticorpi antieritrocitari che possono provocare reazioni emolitiche anche gravissime o fatali.
Questo test viene utilizzato nelle prove di compatibilità pretrasfusionale, nell'esecuzione del "Type and Screen" (T & S), nelle ricerche sul siero materno per la diagnosi di malattia emolitica del neonato (MEN) o su quello di pazienti per la diagnosi di malattia emolitica autoimmune (MEA), nelle ricerche sierologiche che si istituiscono in caso di reazioni trasfusionali.

METODO ORTHO SU COLONNA (procedura manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

- Schedine Ortho BiovueSystem anti-IgG-C3d polispecifiche
- Campione di sangue mescolato con anticoagulante (EDTA)
- Surgiscreen
- Centrifuga Ortho dedicata per schedine
- Incubatore Ortho per schedine
- Centrifuga per provette Heraeus Sephatech Megafuge 1.0
- Pipette calibrate
- Puntali
- Soluzione Fisiologica

PROCEDIMENTO:

- Utilizzare 3 colonnine della schedina Ortho Anti-IgG-C3d polispecifiche
- Contrassegnarle con S1-S2-S3 e il cognome e nome del paziente
- Pipettare 50 µl di soluzione a bassa concentrazione ionica in tampone fosfato utilizzato come soluzione di risospensione o soluzione additiva (Bliss) nei singoli pozzetti
- Pipettare 40 µl di siero del paziente nei singoli pozzetti
- Pipettare 10 µl di S1-S2-S3 nei corrispettivi pozzetti
- Incubare per 10 minuti a 37°C
- Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga dedicata
- Leggere il risultato

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI :
In caso di POSITIVITA' le emazie agglutinate si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione forte 4+) o, comunque all'interno del mezzo con differente score (3+, 2+, 1+, 0.5+).
La positività del test dimostra la presenza di uno o più anticorpi antieritrocitari nel siero o plasma in esame (per l'interpretazione vedi ANTIGRAM).
In caso di positività si dovrà procedere all'identificazione e alla eventuale successiva titolazione dell'anticorpo individuato secondo le procedure in uso nel laboratorio di immunoematologia.
In caso di NEGATIVITA' le emazie libere precipiteranno sul fondo del pozzetto della schedina dove formeranno un bottone.
L'assenza di agglutinazione indica che nel siero in esame non sono presenti anticorpi irregolari.

6.18 TYPE E SCREEN

Lo scopo di questa istruzione di lavoro è di descrivere le azioni per la tipizzazione gruppoematica e l’esecuzione preventiva di una ricerca di anticorpi irregolari nel siero (tramite l’uso di emazie test che comprendano tutti gli antigeni di rilevanza clinica preferibilmente in forma omozigote) di un paziente candidato a un intervento chirurgico e possibile ricevente di una o più trasfusioni di sangue.

Nel caso che la ricerca risulti negativa, si terranno a disposizione di ogni singolo paziente le unità previste, senza eseguire più le prove crociate di compatibilità pretrasfusionale ma limitandosi ad effettuare, subito prima della distribuzione, soltanto un rapido controllo della compatibilità (siero del paziente + emazie del donatore, centrifugazione rapida e lettura per agglutinazione), per mettersi al riparo da eventuali errori di etichettatura o di identificazione e prevenire una possibile reazione da incompatibilità AB0. Anche nel caso di complicanze che richiedano, d’urgenza, ulteriori trasfusioni, ci si limita alla cosiddetta centrifugazione immediata (vedi I.L. “Immediate Spin”): si ottiene, in tal modo, di esitare sangue con la massima celerità e di provvedere, alle necessità del paziente. Un altro aspetto positivo del T&S è quello di non dover riservare, per tempi più o meno lunghi, unità di sangue a un dato paziente, sottraendo queste unità al normale circuito trasfusionale.
Alcuni Autori però sostengono che un certo numero di anticorpi clinicamente significativi non vengono svelati dal T&S (per esempio, anti-Lu^{a}, anti-Kp^{a}, anti Js^{a}, dato che i pannelli eritrocitari utilizzato nel T&S non contengono, di solito, questi antigeni di rarissima incidenza).
E’ naturale che un T&S positivo comporti, da un lato, la necessità di individuare la specificità dell’anticorpo o degli anticorpi evidenziati e, dall’altra, l’obbligo di eseguire la prova di compatibilità pretrasfusionale per ogni unità di emocomponente da trasfondere al paziente in causa.
Nel caso del T&S nessuna unità viene riservata, ma può essere messa prontamente a disposizione previa telefonata del richiedente entro 15 minuti (entro 72 ore dall’invio della richiesta).
Duplice scopo del T&S è quello, da una parte, di evidenziare la presenza nel siero o plasma in esame di eventuali anticorpi antieritrocitari clinicamente significativi e, dall’altra, di eliminare, in caso di ricerca negativa, l’obbligo di eseguire le prove di compatibilità pretrasfusionale
Questa procedura non è opportuna nel caso di pazienti trasfusi nell’ultimo mese.

Si applica su campioni di pazienti provenienti dalle Chirurgie che debbano essere sottoposti ad interventi, compresi quelli per via endoscopica, con probabilità di trasfusione compresa tra lo 0 e il 30% .
Il medico trasfusionista ricorre a questa procedura, provvedendo a convertire la richiesta di prova crociata in richiesta di T&S anche quando sia necessario trasfondere ingenti quantità di sangue e in tempi brevi, oppure in caso di carenza di scorte di sangue, previa comunicazione al medico richiedente.
I campioni di sangue per i test pretrasfusionali non devono risalire a più di 3 giorni (7 giorni) dalla data prevista per la trasfusione.

METODO ORTHO di microagglutinazione su colonna (procedura manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

1. Schedine Ortho Biovue System anti IgG-C3d polispecifiche
2. Campione del paziente in Acido etilendiaminotetracetico (EDTA) o prelievo da siero
3. 3 flaconcini ognuno dei quali contiene eritrociti umani di donatori di gruppo 0 in sospensione al 3% con tampone citrato-fosfato (Surgiscreen 3X3 ml)
4. Centrifuga per schedine ORTHOBIOVUE SYSTEM
5. Incubatore ORTHO per schedine alla temperatura di 37 °C
6. Pipette calibrate
7. Puntali
8. Soluzione fisiologica (S.F.)
9. Soluzione a bassa concentrazione ionica in tampone fosfato (Bliss)
10. Centrifuga Haereus

PROCEDIMENTO:

1. Centrifugare il campione a 3500 rpm per 3 minuti
2. Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente
3. Utilizzare 3 colonnine della schedina Ortho anti IgG-C3d polispecifiche
4. Togliere il film di alluminio della schedina scoprendo solo il numero di pozzetti necessari
5. Contrassegnarli con S1-S2-S3 e i dati anagrafici del paziente
6. Dispensare 50 µl di Bliss nei singoli pozzetti
7. Dispensare 10 µl di S1-S2-S3 nei corrispettivi pozzetti
8. Dispensare 40 µl di siero del paziente nei singoli pozzetti
9. Non toccare la parete della camera di reazione con il puntale della pipetta. Qualora ciò dovesse verificarsi, sostituire i puntali delle pipette prima di procedere alla camera successiva.
10. Osservare che il contenuto della/e camera/e si sia mescolato. Se necessario, agitare delicatamente.
11. Verificare che durante l'incubazione i reagenti rimangano nella camera di reazione. Prima della centrifugazione i reattivi non dovranno mescolarsi con i reagenti della colonna.
12. Incubare per 10 minuti a 37 °C
13. Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga dedicata

INTERPRETAZIONE:

La positività del test viene indicata dall'agglutinazione delle emazie dopo l'aggiunta del siero e dimostra la presenza di uno o più anticorpi antieritrocitari nel siero in esame.

Per l'interpretazione vedi il profilo antigenico allegato ad ogni confezione di Surgiscreen, che elenca gli antigeni presenti in ogni flacone del pannello eritrocitario (Antigram).

In caso di positività si dovrà procedere all'identificazione e alla eventuale titolazione dell'anticorpo individuato. In questo caso la procedura del T&S viene annullata e la richiesta convertita -in sede- in richiesta di prova crociata.

L'assenza di agglutinazione indica al contrario che nel siero in esame non sono presenti anticorpi irregolari i cui antigeni sono presenti negli eritrociti del pannello

6.19 TCD

Il siero antiglobuline umano (siero di Coombs) serve ad individuare, nel test diretto, emazie sensibilizzate “in vivo”.
La proteina sensibilizzante può essere una immunoglobulina o una componente del complemento.
Questo test si applica quando viene richiesto sia da parte dei reparti che dai medici di base e viene utilizzato per la diagnosi di Malattia Emolitica Neonatale (MEN), di Malattia Emolitica Autoimmune (MEA) o quando si sospetti una reazione trasfusionale emolitica.

METODO ORTHO SU COLONNA (procedura manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

- Schedine ORTHO Biovue System anti-IgG-C3d polyspecific oppure schedina ORTHO Biovue System con antisieri monospecifici (anti IgG/anti C3b-C3d/Control)
- Campione di sangue mescolato con anticoagulante (EDTA)
- Centrifuga Ortho per schedine
- Pipette calibrate
- Puntali
- Soluzione Fisiologica: sodio cloruro NaCl allo 0,9% (S.F.)
- Centrifuga Haereus Sephatech Megafuge 1.0 per provette

PROCEDIMENTO:

- Contrassegnare con il nome del paziente una colonnina di una schedina ORTHO anti-IgG-C3d polyspecific oppure 3 colonnine di una schedina ORTHO con antisieri monospecifici (anti IgG/anti C3b-C3d/Control)
- Preparare una sospensione al 3-5% di emazie del paziente (60 µL + 140 µL di soluzione fisiologica).
- Dispensare 10 µL di emazie in sospensione nella/e colonnina/e precedentemente contrassegnata/e.
- Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga per schedine e leggere il risultato.

INTERPRETAZIONE:

In caso di REAZIONE POSITIVA le emazie agglutinate si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione forte 4+) o, comunque, all’interno del mezzo con un differente score (3+, 2+, 1+, 0.5+) e ciò indica che le emazie del paziente sono sensibilizzate o da immunoglobuline o da frazioni complementari.
In caso di REAZIONE NEGATIVA le emazie libere precipiteranno sul fondo del pozzetto della schedina dove formeranno un bottone e ciò indica che le emazie del paziente non sono sensibilizzate né da immunoglobuline né da frazioni complementari.

METODO IN PROVETTA

MATERIALI OCCORRENTI:

- Portaprovette
- Pipette calibrate
- Provette piccole
- Soluzione Fisiologica: sodiocloruro NaCl allo 0.9%.(S.F.)
- Sieri di Coombs monospecifici Biotest anti IgG e anti C3b-C3d
- Centrifuga per provette Heraeus Sephatech Megafuge 1.0
- Agglutinoscopio (viewing box)
- Lente di ingrandimento
- Specchio ingranditore concavo

PROCEDURA:

- Con un pennarello indelebile contrassegnare la provetta su cui eseguire il test con il Cognome e il Nome del paziente.
- Preparare una sospensione di emazie del campione al 3-5 % in soluzione fisiologica
- Aggiungere ad ogni provetta una goccia (50 µL) di sospensione del campione
- Centrifugare a 3000 rpm per 3 minuti e lavare almeno 3 volte le emazie in abbondante fisiologica, decantando scrupolosamente ogni volta (in particolare l'ultima) tutto il sovranatante.
- Aggiungere 2 gocce (100 µL) di appropriato siero antiglobuline.
- Mescolare bene e centrifugare per 1 minuto a 1000 rpm.
- Risospendere dolcemente il sedimento e leggere il risultato.

INTERPRETAZIONE:

Una **reazione negativa** è caratterizzata da una sospensione omogenea lievemente rosata con assenza di agglutinazione e ciò indica che le emazie in esame non sono sensibilizzate né da immunoglobuline né da frazioni complementari.

Una **reazione positiva** determina la comparsa di agglutinati (ammassi eritrocitari) più o meno evidenti) sospesi in un mezzo limpido (quando la reazione è forte) o lievemente rosato (quando la reazione è più debole). L'agglutinazione indica che le emazie in esame sono sensibilizzate o da immunoglobuline o da frazioni complementari .

CAUSE DI POSITIVITA':

Un risultato di DAT positivo può essere dovuto a:

1. Autoanticorpi (con o senza Complemento)
2. Alloanticorpi nel circolo di un ricevente che reagiscono con antigeni presenti sulle emazie di un donatore con cui il paziente è stato trasfuso di recente
3. Anticorpi trasfusi passivamente col plasma o con prodotti da esso derivati (es. IgG, trombina)
4. Anticorpi della madre passati attraverso la placenta.

5. Anticorpi verso farmaci che si legano alla membrana (es. penicillina)
6. Modificazioni della membrana indotti da farmaci (cefalosporine) con assorbimento di proteine (comprese Ig) non specifiche

Presenza di criptoantigeni (in particolari situazioni patologiche

6.20 PROVA CROCIATA IN DIAMED CON ANTI IgG

- Utilizzare schedine Diamed monospecifiche anti- IgG
- Sospendere 10µl di emazie paccate del donatore in 1 mL di Diluente 2

Dispensare nella colonna :

- 50 µl di emazie cosi' preparate
- 25 µl di siero del paziente centrifugato a 3500 per 3’
- Incubare per 20’ a 37°C in sufetta a secco
- Centrifugare nella centrifuga dedicata
- Leggere e interpretare il risultato il risultato

6.21 CROCIATURA A CALDO

Α) Utilizzare schedine Neutral in termostato

Β) Siero del paziente a caldo a bagnomaria per 10 minuti

Χ) Centrifugare a 3500 per 3 minuti, separare il siero e tenerlo a caldo

Δ) Preparare la sospensione delle emazie dei donatori al 3-5% utilizzando S.F. calda

Ε) 40 µl di siero del paziente

Φ) 40 µl di antisiero anti-IgG (non va preriscaldato)

Γ) 10 µl di emazie del donatore/i

Η) Incubare a 37°C per 30 minuti

Ι) Centrifugare

ϑ) Leggere il risultato

6.22 TEST DI COOMBS INDIRETTO CON EMAZIE FICINATE (TCIE)

L'uso di soluzioni di alcuni enzimi proteolitici (per esempio ficina, bromelina, papaina) rafforza e determina la reazione di agglutinazione in fisiologica anche in presenza di anticorpi in grado di sensibilizzare ma non di agglutinare direttamente eritrociti che portano, sulla loro membrana, antigeni verso i quali questi anticorpi sono diretti.
Le ricerche enzimatiche si possono applicare a tutte le indagini sierologiche usate in immunoemetologia ma il maggior impiego è quello della ricerca degli anticorpi irregolari in modo particolare verso antigeni dei sistemi Rh e Kidd.
Gli enzimi proteolitici sono particolarmente efficaci nell'evidenziare autoanticorpi freddi, mentre alcuni determinanti gruppo ematici vengono distrutti dall'uso di questi enzimi.
Gli antigeni tipicamente distrutti sono : M, N, Fya e Fyb.

METODO ORTHO SU COLONNA (procedimento manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

- Schedine Ortho NEUTRAL
- Campione di sangue mescolato con anticoagulante (EDTA)
- Emazie test FICINATE
- Centrifuga per schedine
- Incubatore per schedine
- Puntali

PROCEDURA:

- Utilizzare 3 colonnine della schedina Ortho NEUTRAL
- Contrassegnarle con S1-S2-S3 (emazie test ficinate) e il cognome e nome del paziente
- Dispensare 40µl di plasma del paziente in ogni colonnina
- Dispensare 10 µl di S1-S2-S3 (emazie ficinate) nei corrispettivi pozzetti
- Incubare per 15 minuti a 37°C
- Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga dedicata
- Leggere il risultato

INTERPRETAZIONE:
La positività del test viene indicata dall'agglutinazione delle emazie dopo l'aggiunta del plasma e dimostra la presenza di uno o più anticorpi antieritrocitari nel plasma del paziente in esame (per l'interpretazione si utilizza l'ANTIGRAM presente in ogni confezione).
L'assenza di agglutinazione indica, al contrario, che nel plasma del paziente in esame non sono presenti anticorpi irregolari.

6.23 IMMEDIATE SPIN

Questa prova, nota con la sigla IS (Immediate Spin, cioè centrifugazione immediata), può essere applicata soltanto nel caso in cui si ha la sicurezza che nel siero del ricevente non sono presenti anticorpi irregolari clinicamente significativi, quando, cioè, si è adottata la strategia del Type & Screen (T&S) e che questo sia risultato negativo.
La prova di compatibilità pretrasfusionale con l'I.S. è utile soltanto a evidenziare una eventuale incompatibilità AB0 fra il siero del ricevente e le emazie del donatore.
Si applica ogni qualvolta vi sia richiesta di trasfusione urgente da parte del medico del reparto, che può avvenire previa telefonata del richiedente entro 72 ore dall'invio della richiesta del precedente Test di Coombs indiretto.
L'esecuzione del test richiede 15 minuti.

METODO ORTHO DI MICROAGGLUTINAZIONE SU COLONNA (procedura manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

- Schedine Ortho Biovue System Reverse
- Campione del paziente in EDTA o prelievo da siero
- Centrifuga per schedine ORTHOBIOVUE SYSTEM
- Pipette calibrate
- Puntali
- Soluzione fisiologica (S.F.)

- Centrifuga Haereus

PROCEDURA:

- Verificare sul registro T&S il numero progressivo del paziente, prendere il modulo richiesta prova crociata.
- Prelevare il campione del paziente nel rack dedicato (frigoemoteca P)
- Preparare una sospensione al 3/5% di globuli rossi del/i donatore/i in soluzione fisiologica (40 µL di emazie +960 µL di S.F.)
- Contrassegnare la schedina dedicata con i dati anagrafici del paziente e ogni colonnina con il numero della sacca
- Togliere il film di alluminio della schedina scoprendo solo il numero di pozzetti necessari
- Dispensare 40 µl di siero o plasma del paziente nella camera di reazione di ogni colonnina
- Dispensare 10 µl della sospensione di emazie del donatore nella colonnina corrispondente
- Centrifugare la schedina per 5 minuti nell'apposita centrifuga Ortho
- Leggere il risultato

INTERPRETAZIONE:

La **positività** del test viene indicata dall’agglutinazione delle emazie e dimostra **l’incompatibilità** di gruppo AB0 siero paziente/ emazie donatore.
L’assenza di agglutinazione indica al contrario la **compatibilità** di gruppo AB0 siero paziente/ emazie donatore.

LIMITI:
Alcune incompatibilità AB0 possono non essere individuate da una prova di compatibilità condotta con la tecnica dell’IS, qualora il titolo dell’anticorpo del ricevente sia molto basso o l’antigene sulle emazie del donatore sia insufficientemente espresso.

6.24 TIPIZZAZIONE SU INNOVA 1, 2, 3 , 4

Prima di procedere alla ricerca dell' antigene che si deve tipizzare, l' analista deve preparare:

- Una quantità adeguata di antisiero anti-antigene raro in provetta debitamente barcodata, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome dell'antisiero.
- n° 1 CONTROLLO POSITIVO in provetta debitamente barcodata selezionato da dall'antigram di un pannello A, B o C non ficinato, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome del K pos riferito allo specifico antisiero.
- n° 1 CONTROLLO NEGATIVO in provetta debitamente barcodata selezionato da dall'antigram di un pannello A, B o C non ficinato, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome del K neg, riferito allo specifico antisiero.

Dal sistema operativo dello strumento Innova per ogni tipizzazione:

- Selezionare la voce CAMPIONI
- Selezionare la voce REGISTRA CARICA
- Alla voce PROFILI selezionare il tipo di tipizzazione richiesta: es. S, CW, Fy, Kidd ecc.
- Alla voce TIPO DI CAMPIONE evidenziare SERUM
- In CAMPIONE bippare il barcode della provetta contenente l'antisiero specifico: es. S, CW, Fy, Kidd ecc.
- In NUOVO DONATORE: (CENTERBLOOD) bippare gli identificativi delle provette del paziente o delle sacche da tipizzare, contenenti il sangue ottenuto dal budello della sacca.
- Ancora in NUOVO DONATORE selezionare 3 CELL e bippare gli identificativi dei 2 controlli.
- Confermare con OK
- Selezionare AGGIUNGI ELENCO
- Selezionare INVIA LISTA DI LAVORO
- Selezionare ESCI
- Caricare le provette a bordo
- Al termine effettuare lavaggio (vedi I.O) dello strumento: selezionare
- Manutenzione
- RISCIACQUO.

Interpretazione dei risultati:
Agglutinazione = risultato positivo
No agglutinazione = risultato negativo

<table>
<tr><th>ANTISIERI</th><th>BIOVUE</th><th>Metodica manuale BIOVUE</th><th>Metodica utilizzata dal SISTEMA INNOVA</th></tr>
<tr><td>Anti S</td><td>Coombs Poly</td><td rowspan="10">50 µl di BLISS + 10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a 37°C
Centrifugare 5 min.
Leggere</td><td rowspan="10">50 µl di BLISS + 10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a 37°C
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
<tr><td>Anti s</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Fy-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Fy-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kp-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kp-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Lu-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Lu-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Xga</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti cellano</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kidd-a</td><td>Neutral o Reverse</td><td rowspan="8">10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a TA.
Centrifugare 5 min.
Leggere</td><td rowspan="7">10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
<tr><td>Anti kidd-b</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti C -w</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti Le-a</td><td>Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti Le-b</td><td>Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti M
Diluizione 1:15
(20 µl + 280 µl di fisiologica)</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti P1</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti N
(Diluizione 1:3)</td><td>Neutral</td><td>10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico + 50 µl di Fisiologica.
Incubare 10 min.,
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
</table>

6.25 TIPIZZAZIONE MANUALE

Prima di procedere alla ricerca dell' antigene che si deve tipizzare, l' analista deve preparare:

- Una quantità adeguata di antisiero anti-antigene raro in provetta debitamente barcodata, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome dell'antisiero.
- n° 1 CONTROLLO POSITIVO in provetta debitamente barcodata selezionato da dall'antigram di un pannello A, B o C non ficinato, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome del K pos riferito allo specifico antisiero.
- n° 1 CONTROLLO NEGATIVO in provetta debitamente barcodata selezionato da dall'antigram di un pannello A, B o C non ficinato, dove viene riportato il n° di lotto, scadenza e nome del K neg, riferito allo specifico antisiero.
- Preparare un n° di schedine sufficienti per l'esecuzione del test e il tipo, in base all'antigene da tipizzare, secondo la tabella n°1.

PROCEDIMENTO OPERATIVO:

- Contrassegnare ogni singolo pozzetto della schedina con l'identificativo della sacca o del paziente
- Preparare le provette contenenti il sangue proveniente dai segmenti delle sacche o del paziente (vedi I.O.)
- Effettuare una diluizione al 3-4% delle provette delle sacche o del paziente
- Preparare i boccettini del Panel A (ORTHO) con i controlli positivo e negativo già diluiti al 4%
- Dispensare in tutti i pozzetti (compreso il controllo positivo e negativo) una quantità di antisiero secondo la tabella 1.
- Dispensare 10 µl di emazie delle sacche o del paziente diluite al 3-4%
- Dispensare 10 µl di emazie dei controlli positivo e negativo nei rispettivi pozzetti
- Incubare secondo lo schema della tabella 1
- Centrifugare nell'apposita centrifuga Ortho per 5 min.
- Leggere il risultato per agglutinazione

INTERPRETAZIONE DEI RISULTATI

Agglutinazione = risultato positivo
No agglutinazione = risultato negativo

Tabella 1

<table>
<tr><th>ANTISIERI</th><th>BIOVUE</th><th>Metodica manuale BIOVUE</th><th>Metodica utilizzata dal SISTEMA INNOVA</th></tr>
<tr><td>Anti S</td><td>Coombs Poly</td><td rowspan="10">50 µl di BLISS + 10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a 37°C
Centrifugare 5 min.
Leggere</td><td rowspan="10">50 µl di BLISS + 10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a 37°C
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
<tr><td>Anti s</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Fy-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Fy-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kp-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kp-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Lu-a</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Lu-b</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Xga</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti cellano</td><td>Coombs Poly</td></tr>
<tr><td>Anti Kidd-a</td><td>Neutral o Reverse</td><td rowspan="8">10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Incubare 10 min. a TA.
Centrifugare 5 min.
Leggere</td><td rowspan="7">10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico.
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
<tr><td>Anti kidd-b</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti C -w</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti Le-a</td><td>Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti Le-b</td><td>Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti M
Diluizione 1:15
(20 µl + 280 µl di fisiologica)</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti P1</td><td>Neutral o Reverse</td></tr>
<tr><td>Anti N
(Diluizione 1:3)</td><td>Neutral</td><td>10 µl di emazie al 4% + 40 µl di antisiero specifico + 50 µl di Fisiologica.
Incubare 10 min.,
Centrifugare 5 min.
Lettura</td></tr>
</table>

6.26 DIAGRAMMA IN CASO DI PROVA CROCIATA POSITIVA

La positività può essere dovuta :

- *Errore di gruppo*
- *Presenza di anticorpi irregolari nel siero del paziente*
- *TCD positivo della sacca*
- *TCD positivo del paziente*
- *Interferenza da BLISS*

- Ricontrollare il gruppo diretto del paziente in schedine ABD e il fenotipo Rh .
- Eseguire TCI ed eventualmente TCIE
  - Se positivo eseguire Pannello (A/ B/ C ficinato)
- Eseguire TCD frazionato (TCDC-TCDG) sulle emazie della sacca prelevate dall'interno in modo sterile.
- Eseguire TCD frazionato sulle emazie del Paziente
  - Se TCDG positivo eventuale WARM (Vedi Parag. 6.16)
  - Se TCDC positivo questo può essere dovuto a interferenza da complemento e quindi ricrociare in schedine monospecifiche IgG DIAMED (Vedi Parag. 6.20); oppure a presenza di Agglutinine fredde e in tal caso ricrociare a caldo (Vedi Parag. 6.21)
- INTERFERENZA DA BLISS: ricrociare senza mezzo potenziante prolungando l'incubazione per almeno 30 minuti.

6.27 PROVA CROCIATA

Lo scopo di questa istruzione di lavoro è di descrivere le azioni che devono essere compiute in caso di richiesta di Prova Crociata
Questo test si applica quando viene richiesto sia da parte dei reparti che dai medici di base (in caso di domicilio) per pazienti che necessitano o potrebbero avere necessità di trasfusione di sangue.

MATERIALI OCCORRENTI:

1. Schedine Ortho Biovue System anti-IgG-C3b polyspecific
2. Campione di sangue del paziente mescolato con anticoagulante (Etilendiaminotetraacetato EDTA)
3. Campioni di sangue dei budellini (delle sacche di sangue abbinate): **emazie donatore**
4. Centrifuga Ortho per schedine
5. Incubatore per schedine
6. Pipette calibrate
7. Puntali monouso
8. Soluzione a bassa concentrazione ionica in tampone fosfato utilizzato come soluzione di risospensione o soluzione additiva (Bliss)
9. Soluzione Fisiologica: Sodio Cloruro NaCl allo 0.9% (S.F.)
10. Centrifuga per provette Heraeus Sephatech Megafuge 1.0

PROCEDURA:

1. Utilizzare tante colonnine della schedina Ortho Anti-IgG-C3d polispecifiche quante sacche da crociare.
2. Contrassegnarle con 1, 2, 3, etc, e il cognome e nome del paziente
3. Pipettare 50 µl di Bliss nei singoli pozzetti
4. Pipettare 40 µl di siero del paziente nei singoli pozzetti
5. Pipettare 10 µl di emazie donatore diluite al 3-5 % con S.F. nei corrispettivi pozzetti(1,2,3..)
6. Incubare per 10 minuti a 37°C
7. Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga per schedine
8. Leggere il risultato
9. ATTENZIONE: Ad ogni paziente che deve eseguire la PC si deve effettuare il controllo del gruppo (Vedi I.L.)

INTERPRETAZIONE:
In caso di positività le emazie agglutinate si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione forte 4+) o, comunque, all’interno del mezzo con un differente score (3+, 2+, 1+, 0.5+). Tale positività dimostra la presenza di uno o più anticorpi antieritrocitari nel siero in esame, quindi la Prova Crociata è **Positiva** e il sangue del donatore **non è compatibile** con il siero del paziente.

In caso di negatività le emazie non agglutinate precipiteranno sul fondo del pozzetto della colonnina dove formeranno un fondello. Tale negatività indica che il sangue del donatore **è compatibile** con il siero del paziente e la prova crociata si definisce **Negativa**.

6.28 RICERCA VARIANTE D^u

Lo scopo di questa istruzione di lavoro è di descrivere le azioni che devono essere compiute per la individuazione del “D Debole “ o“D^U”.
Il “D Debole” possiede un numero di epitopi molto inferiore rispetto all’Antigene pienamente espresso che può averne circa 15.000-30.000.
Questa variante deve essere distinta dalla variante definita “D Parziale “ che manca di alcuni dei 9 epitopi presenti sul polipeptide D.
Il fenotipo “D Debole” è scarsamente immunogeno ma il soggetto portatore può produrre Anticorpi anti –D se trasfuso con eritrociti D+.
Pertanto deve essere considerato D+ come donatore e D- come ricevente.
Questo test deve essere eseguito per effettuare la fenotipizzazione delle emazie dei donatori, della madre e del neonato (Malattia Emolitica del neonato, MEN) che hanno dato esito negativo al test con anti-D.

METODO ORTHO IN SCHEDINA

<u>MATERIALI OCCORRENTI</u>:

- Schedine Ortho Biovue System anti-IgG-C3d polispecifiche
- Campione di sangue mescolato con anticoagulante (Etilendiaminotetraacetato, EDTA)
- Campione di emazie di donatore “DU” POSITIVO di donatore periodico fornito dal Settore Tipizzazione Gruppi
- Soluzione a bassa concentrazione ionica in tampone fosfato utilizzato come soluzione di risospensione o soluzione additiva, Bliss
- Soluzione Fisiologica: sodiocloruro NaCl allo 0.9%.(S.F.)
- Antisiero Ortho BioClone anti-D IgM+IgG
- Incubatore Ortho per schedine
- Centrifuga Ortho per schedine
- Pipette calibrate
- Puntali
- Centrifuga Haereus

<u>PROCEDIMENTO:</u>

- Portare tutti i reagenti a temperatura ambiente
- Utilizzare 3 colonnine della schedina Ortho Poly anti –IgG-C3d
- Contrassegnare la 1^a con il campione da esaminare la 2^a con KNEG e la 3^a con K POS
- Preparare una sospensione al 3-5% (40µL di emazie + 960 µL di S.F.) di :

*emazie del campione da esaminare
*emazie di un donatore Rh negativo
*emazie di un donatore Du positivo

- Dispensare 50 µL di BLISS in tutte e 3 le colonnine
- Dispensare 10 µL di emazie del campione e dei donatori nelle rispettive colonnine
- Dispensare 40 µL di antisiero anti-D (IgM+IgG)nella prima e nella terza colonnina (campione e KPOS)

- Dispensare 40 µL di S.F. nella colonnina (KNEG)
- Incubare la schedina a 37°C per 10-20 minuti.
- Centrifugare nella centrifuga Ortho dedicata.
- Leggere i risultati.

INTERPRETAZIONE:
Se è presente agglutinazione nella colonnina 1 e 2 ciò sta ad indicare che le emazie erano già sensibilizzate, con tali cellule non è possibile procedere per una ricerca accurata dell'antigene Du.
In caso di POSITIVITA' le emazie agglutinate con il siero antiglobuline si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione forte 4 +) o, comunque, all'interno del mezzo con un differente score (3+; 2+; 1+).
La positività nella colonnina 1 evidenzia la presenza di fenotipo "DU+" e quindi la tipizzazione del donatore o del paziente come RH "DU POSITIVO".
In caso di reazione NEGATIVA nella colonnina 1 le emazie libere precipiteranno sul fondo del pozzetto della colonnina dove formeranno un bottone.
La negatività evidenzia l'assenza di fenotipo "DU" e quindi la tipizzazione del donatore o del paziente come RH NEGATIVO.

6.29 RICERCA ANTIGENE CELLANO

Lo scopo di questa istruzione di lavoro è di descrivere le azioni che devono essere compiute nei casi in cui debba essere attuata questa ricerca.
Si applica su tutti i donatori Kell positivi e nei pazienti in cui precedenti trasfusioni o gravidanze abbiano provocato una immunizzazione contro questo fattore.
Gli eritrociti che non reagiscono con siero Anti-k (anti cellano) sono di genotipo KK,omozigoti per il fattore K (Kell).

2.1 METODO ORTHO SU COLONNA (procedimento manuale)

MATERIALI OCCORRENTI:

- Schedine Ortho Biovue System anti IgG-C3d polispecifiche.
- Provetta del donatore/paziente in EDTA
- Antisiero anti –cellano ditta ORTHO
- Soluzione a bassa concentrazione ionica in tampone fosfato utilizzato come soluzione di risospensione o soluzione additiva (Bliss)
- Centrifuga Ortho per schedine
- Incubatore Ortho per schedine
- Puntali
- Pannello C, B o A
- Soluzione fisiologica

PROCEDURA:

- Portare tutti i reagenti da utilizzare a Temperatura Ambiente
- Utilizzare tre colonnine della schedina Ortho Poly
- Contrassegnare una colonnina con il nome del campione; una colonnina con K POS e l'ultima con K NEG. Per i controlli utilizzare le emazie del pannello B, C o A nelle quali ci sia almeno una cellula cellano negativa (KK).
- Preparare una sospensione al 3-5% di emazie del campione da esaminare (40 µL di emazie + 960µL di SF)
- Dispensare 50 µL di Bliss nelle tre colonnine
- Dispensare 10 µL di emazie del campione in sospensione nella rispettiva colonnina
- Dispensare 10 µL dei controlli (positivo e negativo) nelle rispettive colonnine
- Dispensare 40 µL di Antisiero anti- CELLANO nelle tre colonnine
- Incubare la schedina a 37°C per 10-15 minuti nell'incubatore dedicato
- Centrifugare per 5 minuti nella centrifuga dedicata
- Leggere i risultati

INTERPRETAZIONE:

- In caso di POSITIVITA' le emazie del donatore o del paziente che reagiscono con il siero anti -K si fermeranno sulla superficie della colonnina della schedina (reazione

forte 4+) o, comunque all'interno del mezzo, con un differente score (3+,2+,1+,0.5+) = Genotipo Kk.

- In caso di NEGATIVITA' le emazie del donatore o del paziente non reagiscono con il siero anti-K e libere precipiteranno sul fondo del pozzetto della schedina dove formeranno un bottone = Genotipo KK.

6.30 RICERCA ANTIGENI RARI CON CETRAPLUS

Si applica ogni volta che in una prova crociata siano stati identificati gli anticorpi diretti contro un antigene di un paziente mediante PANEL ORTHO A, B o C ficinato o non ficinato. Le sacche che si ricercano devono necessariamente essere prive dei medesimi antigeni rari che in genere appartengono ai seguenti sistemi:

- Kidd
- Duffy
- S/s
- M
- Cellano

- ✓ **EMOTECA**
- ✓ **RICERCA**
- ✓ Scelta filtro: **RICERCA Ag RARI**

RICERCA UNITÀ

Scelta filtro:

- ✓ Cliccare sull'icona del **foglio con la lente** di fianco alla scritta : **TIPIZZAZIONE-**
- ✓ In **ANTIGENI RARI cliccare sul quadratino a lato della lente di ingrandimento e sulla lente di ingrandimento stessa**

Cliccare sul punto di domanda e selezionare la sigla dell'Antigene ricercato inserendo in **Valore** un **-**

TIPIZZAZIONE

ANTIGENI RARI

Antigeni Rari

Valore

- ✓ **CONFERMA** (flag verde)
- ✓ **Chiudere con la x rossa**
- ✓ **CONFERMA**
- ✓ In **GRUPPO ABO**: indicare il **gruppo richiesto** (se non si indica nulla la ricerca comprende tutti i gruppi)
- ✓ In **FENOTIPO Rh** indicare il **fenotipo del paziente**

TIPIZZAZIONE

Antigeni Rari	Fya-	Antigeni HLA		Anticorpi Irregolari	
Gruppo AB0		Fattore Rh		Ricerca Du	
Fenotipo Rh		Gruppo Kell			

- ✓ **CONFERMA** (flag verde)

- ✓ Cliccare sull'icona **STAMPA**
- ✓ Cliccare sull'icona **STAMPA**

6.31 ESECUZIONE PROVA CROCIATA IN PROVETTA

Metodica Coombs senza potenziante

- Allestire un n° di provette contrassegnate con il n identificativo dell'unita'
- Porre 2 gocce del plasma del paziente in ogni provetta
- Aggiungere una goccia di emazie del donatore sospese al 3-5%
- Incubare per 60' a 37 in bagnomaria
- Centrifugare e osservare l'eventuale presenza di emolisi e agglutinazione; registrare i dati
- Lavare manualmente per 3 volte con soluzione fisiologica e decantare
- Aggiungere 2 gocce di siero di Coombs polispecifico anti IgG - C3d.
- Centrifugare a 1500 rpm per 1’
- Osservare l'eventuale presenza di agglutinati con l'ausilio dell'agglutinoscopio
- Registrare i risultati

Se la ricerca è positiva procedere con l’identificazione dell'anticorpo.

NB: ALLESTIRE SEMPRE UN CONTROLLO POSITIVO UTILIZZANDO LE EMAZIE DI UN DONATORE DI GRUPPO 0 POS SOSPESE AL 3-5% E SIERO ANTI-D (BIOCLONE IgG/IgM ortho).

Metodica LISS-Coombs

- Allestire un n° di provette contrassegnate con il n identificativo dell'unita'
- Porre 2 gocce di plasma del paziente in ogni provetta
- Aggiungere una goccia di emazie del donatore sospese al 3-5%
- Aggiungere 2 gocce di soluzione potenziante (LISS) in ogni provetta
- Incubare per 10' a 37°C in bagnomaria
- Centrifugare e osservare l'eventuale presenza di emolisi e agglutinazione e registrare i dati
- Lavare manualmente per 3 volte con soluzione fisiologica e decantare
- Aggiungere 2 gocce di siero di Coombs polispecifico anti IgG - C3d.
- Centrifugare a 1500 rpm per 1’
- Osservare l'eventuale presenza di agglutinati con l’ausilio dell’agglutinoscopio
- Registrare i risultati
- Se la ricerca è positiva procedere con l’identificazione dell'anticorpo

NB: ALLESTIRE SEMPRE UN CONTROLLO POSITIVO UTILIZZANDO EMAZIE DI UN DONATORE DI GRUPPO 0 POS SOSPESE AL 3-5% E SIERO ANTI-D (BIOCLONE IgG/IgM ortho).

6.32 DETERMINAZIONE GRUPPO DIRETTO IN SCHEDINA CON ESECUZIONE MANUALE

MATERIALI OCCORRENTI:

- campione del paziente in EDTA
- provettine di plastica per diluizione
- centrifuga per schedine ORTHOBIOVUE SYSTEM
- centrifuga per campioni ematici
- soluzione salina isotonica 0.9%
- pipetta calibrata da 10 µl
- pipetta calibrata da 500 µl
- puntali monouso (da 1000 µl e da 200 µl)
- **schedine** ORTHO Biovue System **antiA/antiB/antiD**
- liner (per aprire le schedine)

PROCEDURA

1. centrifugare il campione del paziente per 3 minuti a 3600 giri
2. preparare una sospensione di eritrociti al 5% circa (950 µL di Soluzione Fisiologica + 50 µL di emazie) segnando il cognome del paziente sulle provette utilizzate
3. scrivere il nome del paziente (campione) in corrispondenza dei 3 pozzetti interessati
4. aprire i pozzetti della schedina ORTHO con apposito liner
5. pipettare 10 µl della sospensione di eritrociti in ogni singolo pozzetto (A-B-D)
6. centrifugare per 5 minuti in apposita centrifuga ORTHO
7. leggere per agglutinazione
8. interpretazione dei risultati

INTERPRETAZIONE:
*La **positività** del test viene indicata dall'agglutinazione delle emazie.*
***L'assenza di agglutinazione** indica al contrario la **negatività** della reazione*

6.33 DETERMINAZIONE GRUPPO INDIRETTO IN SCHEDINA CON ESECUZIONE MANUALE

MODALITA' OPERATIVE

<u>*MATERIALI OCCORRENTI:*</u>

- campione del paziente in EDTA
- centrifuga per schedine ORTHOBIOVUE SYSTEM
- centrifuga per campioni ematici
- emazie A1, B, O del commercio
- pipetta calibrata da 10 µl
- pipetta calibrata da 40 µl
- puntali monouso (da 200 µl)
- schedine ORTHO Biovue System **REVERSE DILUENT**
- liner (per aprire le schedine)

PROCEDURA

1. centrifugare il campione del paziente per 3 minuti a 3600 giri
2. **scrivere il nome del paziente** (campione) in corrispondenza dei 3 pozzetti interessati
3. **identificare ogni singolo pozzetto** rispettivamente con A1,B, 0
4. aprire i pozzetti della schedina ORTHO REVERSE con apposito liner
5. **pipettare 40 µl del plasma** del paziente in ognuno dei 3 pozzetti
6. **pipettare 10 µl della sospensione di eritrociti** del commercio in ogni singolo pozzetto (A1-B-0) (AFFIRMAGEN)
7. centrifugare 5 minuti in apposita centrifuga ORTHOBIOVUE SYSTEM
8. leggere per agglutinazione
9. interpretazione dei risultati

<u>*INTERPRETAZIONE:*</u>

*La **positività** del test viene indicata dall'agglutinazione delle emazie.*
***L'assenza di agglutinazione** indica al contrario la **negatività** della reazione*

6.34 REFERTAZIONE

Il personale laureato valida l'esito dell'indagine eseguita e predispone un FDL (foglio di lavoro) riassuntivo a fine giornata, nel settore tipizzazione gruppi donatori e gruppi pazienti.
I referti ed il relativo riassuntivo vengono successivamente stampati.
Il FDL viene inserito in un apposito raccoglitore,mentre i referti vengono ritirati dal personale preparatore che li smista in base al codice a due cifre che individua le U.U.O.O. o i Servizi richiedenti, li inserisce in una busta contrassegnata da un'etichetta che ne reca la denominazione con il codice a due cifre e ne sigilla la busta.
Il personale preparatore porta le buste sigillate nella cassetta della posta aziendale sino alle ore 13,00 di tutti i giorni feriali.Dopo tale orario ma anche nei prefestivi e festivi i referti possono essere ritirati direttamente dal personale di reparto o dall'unità di trasporto dell'Azienda Ospedaliero-Universitaria di Parma presso il Servizio Immunotrasfusionale Settore Distribuzione Emocomponenti .

6.35 PANNELLO DI EMAZIE TEST PER L'IDENTIFICAZIONE DI ANTICORPI IRREGOLARI (PANEL A/B/C)

METODO ORTHO su colonna (procedura manuale)

Materiali occorrenti:

1. Schedine Ortho Biovue System anti IgG-C3d polispecifiche (Panel A/B)
2. Schedine Ortho Biovue System NEUTRAL (Panel C)
3. Campione di sangue con anticoagulante (EDTA) o siero
4. RESOLVE panel A, B o C
5. Centrifuga Ortho dedicata per schedine
6. Incubatore Ortho per schedine
7. Centrifuga per provette Heraus Sephatech Megafuge 1.0
8. Pipette calibrate
9. Puntali.
10. Fisiologica

PROCEDIMENTO MANUALE :

1. Utilizzare due schedine Ortho Anti IgG-C3d polispecifiche contrassegnate con il cognome del paziente
2. Numerare da 1 a 11 le colonne in caso di Panel A o C, da 12 a 22 in caso di Panel B, e contrassegnare con A l'ultima colonna (Autocontrollo =Emazie Paziente + Siero Paziente)
3. Pipettare 50 µl di Bliss
4. Pipettare 40 µl di plasma o siero del paziente
5. Pipettare 10 µl di emazie di ciascun boccetto del pannello utilizzato per l'identificazione degli anticorpi irregolari nelle colonne corrispondenti
6. Nel Pozzetto "A" pipettare 10 µl di emazie del paziente sospese in fisiologica al 3-5%
7. Incubare per 15 minuti a 37° C
8. Centrifugare con centrifuga ORTHO e leggere i risultati

PROCEDIMENTO MANUALE IN FISIOLOGICA :

1. Utilizzare due schedine Ortho NEUTRAL contrassegnate con il cognome del paziente
2. Numerare da 1 a 11 le colonne in caso di Panel A o C, da 12 a 22 in caso di Panel B,e contrassegnare con A l'ultima colonna (Autocontrollo =Emazie Paziente + Siero Paziente)
3. Pipettare 40 µl di plasma o siero del paziente
4. Pipettare 10 µl di emazie di ciascun boccetto del pannello, utilizzato per l'identificazione degli anticorpi irregolari, nelle colonne corrispondenti
5 Nel Pozzetto "A" pipettare 10 µl di emazie del paziente sospese in fisiologica al 3-5%
6 Incubare per almeno 30 minuti a Temperatura ambiente.
7 Centrifugare con centrifuga ORTHO e leggere i risultati.

PROCEDURA AUTOMATIZZATA MEDIANTE STRUMENTO INNOVA

1. predisporre correttamente le 11 cellule del pannello prescelto estraendole dal frigo
2. caricarle sull'apposito rack dello strumento Innova
3. inserire il profilo sullo strumento nel seguente modo:

- *CAMPIONI*
- *REGISTRA / CARICA*
- *PRIORITA' : NORMALE*
- *PROFILO : (Panel A e ACTRL))*
- *CAMPIONI (BIPPARE IL BARCODE DELLA PROVETTA)*
- *INVIA LISTA DI LAVORO*
- *ESCI*

INTERPRETAZIONE:
Confrontare il risultato col profilo antigenico ANTIGRAM®, inserito della confezione del reattivo utilizzato, per l'identificazione dell'anticorpo.
Il siero del paziente deve essere:
√ Positivo con almeno 3 cellule con l'antigene
√ Negativo con almeno 3 cellule senza l'antigene
affinchè le probabilità che l'anticorpo sia correttamente identificato siano > 95%.
Inoltre solo se il paziente non è stato recentemente trasfuso occorre tipizzare le emazie del paziente per l'antigene corrispondente all'anticorpo rilevato nel siero del paziente (il risultato atteso è negativo per la presenza del rispettivo antigene). Infine l'autocontrollo deve essere negativo.
Se non vengono soddisfatte queste condizioni bisogna testare altre cellule / pannelli diversi anche con emazie test pretrattate enzimaticamente (gli anticorpi diretti contro gli antigeni del sistema Rh (D,C, E, c, e. f, Vc, VS, CW) Kidd, I, e Lewis vengono potenziati dal trattamento enzimatico delle emazie; i gruppi (M, N, S, Fya, Fyb, Xg) vengono distrutti dagli enzimi.

Alternativamente è possibile utilizzare il software RESOLVIGEN (Ortho Clinical Diagnostics).

SOFTWARE RESOLVIGEN
E' un ausilio informatizzato fornito da Ortho Clinical Diagnostics nell'interpretazione dei pannelli per la identificazione di anticorpi irregolari nel siero di pazienti o donatori.

Operazioni preliminari: periodicamente in posta elettronica vengono inviati da Ortho (nella persona di Nicolini) ai nominativi dei dirigenti medici e biologi i file Ortho con gli aggiornamenti dei lotti nuovi dei vari tipi di reagenti necessari per la ricerca e identificazione degli anticorpi irregolari (es. Biovue Ficin, Surgiscreen,…). Occorre salvarli su un supporto informatico (floppy, chiave USB) e inserirli nel software Resolvigen al fine di consentire la successive procedura di lettura e interpretazione dei pannelli Ortho. Procedere così:

1- inserire il floppy (o chiave USB)
2- nel programma Resolvigen selezionare MENU' PANNELLI
3- IMPORTA PANNELLI (conviene importarli tutti)
4- RICARICA
5- OK

Compaiono i pannelli VALIDI anche se in memoria ha ancora quelli scaduti. Una volta caricati togliere il floppy (o chiave USB).
N.B. Per la prima volta che importiamo es. Panel B chiederà oltre al lotto anche la metodica (Coombs IgG+ C3d) e il tipo di pannello (Panel B).
N.B. Si possono vedere facendo un doppio clic e si possono stampare (selez. nel Menù Pannelli – stampa)

6) inserire la chiavetta USB dedicata disponibile all'interno del manualetto di istruzione all'uso
7) Accedere cliccando al software Resolvigen sul desktop dello Strumento innova dopo aver verificato che non stia lavorando
8) Vi sono varie opzioni: pannelli (contiene l'elenco dei pannelli memorizzati) , pazienti (anagrafiche dei pazienti che importeremo, archivio storico delle diverse identificazioni in relazione ai pazienti), emazie rare (donatori tipizzati) , Test (tutto l'elenco dei test che si effettuano

Procedimento

Una volta effettuato il Test di Coombs Indiretto su Innova e che sia risultato positivo e accettato si effettua il pannello (Panel A,B, C). Al termine si trasmette informaticamente ad host e fa un pacchettino per Resolvigen (si può vedere in Connessione LISS)
iconizziamo il programma e
apriamo resovigen

1- ARCHIVI
2- STRUMENTI
3- AUTOVUE-

Es. configurazione pannelli Innova (maschera blu) :
codice ottico 0554 evidenziato
Codice RA554 evidenziato

4) OK
5) COMPARE SCHEDINA
6) PAZIENTE SCONOSCIUTO
7) OK

Maschera test per identificazione Ab :

ELENCO TEST
- Panel A se c'è TCI e Fenotipo ..
- Doppio clic si apre e si vede il pannello col tasto dx vedo l'immagine dei pozzetti

NUOVO TEST (dati esecuz. Test)
(si possono aggiungere a mano tutti i test fatti altrove : aggiungere test e lotto
Sotto la voce "Emazie autologhe" TCD e AUTO

8) Selezionare DIAGNOSI e il software elabora in percentuale le identificazioni degli anticorpi irregolari in ordine decrescente di probabilità.

Per poter avere un referto occorre scrivere nelle note la nostra interpretazione e la nostra conclusione
Cliccando posso vedere la descrizione dettagliata dei vari Ab- selezionare STAMPA

Per salvare il test dare OK

♣♣♣

Se voglio inserire un pannello eseguito altrove o a mano:

1. selezionare PAZIENTE
2. AGGIUNGI PAZIENTE
3. Compare una maschera in cui inserisco i dati del paziente (cognome, … gruppo , fenotipo)
4. OK e lo ritroverò nell'elenco,

5. lo seleziono: paziente
6. IDENTIFICAZIONE Ab
7. Compare una maschera tipo
8. nella tendina vado a vedere TCI o Pannello evidenzio quello desiderato e vado a inserire
9. aggiungi
10. modifica
11. ok
12. DIAGNOSI

6.36 BLOCCO INFORMATICO SETTORE PROVE CROCIATE

Eseguire solo prove crociate-type screen e gruppi urgenti

I campioni pervenuti devono essere etichettati con un codice a barre fittizio e su tutti va eseguito:

- **Gruppo diretto e indiretto (Gruppo Urgente)**

<u>Prove crociate-type screen</u>

<u>Abbinamento unità di emazie</u>

- verificare la corrispondenza tra nome e cognome del paziente ed il codice a barre fittizio apposto come identificativo dal tecnico dell'accettazione su:

1. retro della richiesta di prova crociata e/o Type & Screen
2. provetta dove si è spremuto il budellino della sacca corrispondente.

- compilare il foglio di accompagnamento sacche MOD…..ed unirlo alle unità abbinate

I test vengono effettuati in schedina su strumentazione Autovue Innova (ORTHO); l'esito delle analisi deve essere trascritto sui registri Type & Screen e/o Prove Crociate e firmato dal Responsabile di settore.
La lettura delle analisi deve essere fatta dal Responsabile con la collaborazione di un secondo operatore.

Si consiglia di stampare dallo strumento le immagini relative ai risultati dei campioni processati.

Nel caso di pazienti provenienti da ospedali esterni con gruppo noto, non si ritiene necessario richiedere un secondo controllo di gruppo.

Una volta ripristinato il blocco ,tutti i campioni ,trattati durante l'assenza di informatizzazione, vanno **accettati ,inseriti** nel gestionale **e i risultati convalidati da due operatori.**

Eseguire solo gruppi in urgenza-emergenza

- verificare la corrispondenza tra nome e cognome del paziente ed il codice a barre fittizio apposto come identificativo dal tecnico dell'accettazione su:

1. campione
2. richiesta

- **eseguire sia il gruppo diretto che indiretto** (vedi IO) sul campione.
- Leggere
- validare il risultato.
- compilare il modulo di risposta cartaceo da consegnare ai reparti solo in caso di urgenza

- **Ripristinato il blocco informatico tutti i campioni trattati durante l'assenza di informatizzazione vanno inseriti nel gestionale dopo accettazione, e i risultati devono essere convalidati da due operatori.**

Nel caso di fermo macchina eseguire il gruppo (solo in urgenza) con tecnica manuale (vedi Manuale operativo di Immunoematologia)

DEVE ESSERE EFFETTUATO L'I.S. su tutti i pazienti che ritirano unita' di emazie dopo esecuzione di type screen (negativo).
NON DEVE ESSERE EFFETTUATA assegnazione con procedura rapida.